



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA EM REDE DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - BIONORTE**



**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS NATIVOS DA REGIÃO AMAZÔNICA E
DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Magda Márcia Becker

São Luís, MA

Fev/2019

MAGDA MÁRCIA BECKER

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS NATIVOS DA REGIÃO AMAZÔNICA E
DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Rede em Biodiversidade e Biotecnologia - BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Gilvanda Silva Nunes - UFMA

Coorientadores: Prof. Jean-Louis Marty - UPVD e Prof.^a Dra. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes - UFRR

São Luís, MA

Fev/2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Becker, Magda Márcia.

Caracterização de frutos nativos da região amazônica e desenvolvimento de um biossensor amperométrico para determinação da capacidade antioxidante / Magda Márcia Becker. - 2019.

183 f.

Orientador(a): Gilvanda Silva Nunes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Biossensor amperométrico. 2. Capacidade antioxidante. 3. Composição mineral. 4. Compostos bioativos. 5. Frutos amazônicos. I. Nunes, Gilvanda Silva. II. Título.

MAGDA MÁRCIA BECKER

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS NATIVOS DA REGIÃO AMAZÔNICA E
DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Rede em Biodiversidade e Biotecnologia -
BIONORTE, da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gilvanda Silva Nunes

Coorientadores: Prof. Jean-Louis Marty e Prof^ª. Dr^ª. Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes

Banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Gilvanda Silva Nunes
Orientador- Presidente da banca

Prof^ª. Dr^ª. Hideko Yamanaka
Examinador 2 – externo

Prof. Dr. Auro Autsush Tanaka
Examinador 3 – interno

Prof. Dr. Glécio Machado Siqueira
Examinador 4 – interno

Prof. Dr. Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques
Examinador 5 – externo

Fev/2019

À Deus

“Por mais uma graça concedida”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza, pela família, trabalho, estudos e pela vida repleta de bênçãos;
À Universidade Federal do Maranhão que, por meio do Programa de Pós-Graduação em Rede em Biodiversidade e Biotecnologia - BIONORTE, me propiciou condições para a realização desse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro;

Aos professores Gilvanda Silva Nunes, Jean-Louis Marty e Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes, pela orientação, conhecimentos compartilhados, apoio incomensurável e paciência durante a realização desse trabalho;

À minha mãe, Noeli Rost Becker, ao meu pai, Pedro Mário Becker, às minhas irmãs, Mírian Mirna Becker, Marina Nádia Becker e Mônica Elaine Becker e ao meu sobrinho afilhado Pedro Guilherme Becker, pelo auxílio e incentivo durante a realização desse trabalho;

Ao meu esposo, Jonathan Alberto Oliveira, e à minha filha, Ana Júlia Becker Oliveira, amores eternos, pelo apoio constante que foram fonte de energia para vencer os desafios;

Aos amigos e colegas do Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas, em especial aos amigos Laiane, Carol, Jaciara, Thalissa, Francisco Eduardo, Diogo, Eliane, Danilo, Marlon e Yan, pelo companheirismo e momentos de descontração;

À toda a equipe de professores e estudantes do Laboratório *Biosensors-Analyses-Environment* (BAE) da Universidade de Perpignan Via Domitia (UPVD) pelo acolhimento e colaboração;

Ao professor Lídio Gonçalves Lima Neto e ao seu grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias do UniCeuma, e o MSc. Vinicyus Teles Chagas, pela disponibilidade e colaboração em uma etapa desse trabalho;

Aos professores Marcos José Salgado Vital e Gardênia Holanda Cabral, do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da UFRR, pela colaboração;

Aos técnicos da UFMA e UFRR pelo companheirismo e assistência;

Aos colaboradores Ana Elene dos Santos (madrinha), Clair dos Santos, Adriana Kramer, Rejane Uchoa, Caroline Farias, Marlene e Antônio, pela cooperação na coleta dos frutos;

A todos os amigos que, de alguma forma, me auxiliaram na conclusão deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2015-2018

Comunicação em Congressos na forma de Pôster

1. **BECKER, M. M.**; SILVA, F.E.P.S.; MANDAJI, C.M.; MEDEIROS, I.J.S.; MALTA, T.A.; SOUTO, L.A.S.; MORAES, J.F.; MENDES, T.M.F.F.; NUNES, G.S. Essencialidade e toxicidade de manganês e cobre em amostras de frutos da Amazônia Brasileira. 56º Congresso Brasileiro de Química. Química: Tecnologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. Belém, Brasil. 2016.
2. **BECKER, M. M.**; SILVA, F.E.P.S.; MOUCHREK, A.N.; FILHO, V.E.M.; SOUTO, L.A.S.; MANDAJI, C.M.; MENDES, T.M.F.F.; NUNES, G.S. Perfil proteico de frutos nativos da Amazônia Brasileira. 56º Congresso Brasileiro de Química. Química: Tecnologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. Belém, Brasil. 2016.
3. SOUTO, L. A. S.; SILVA, F. G. S.; MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; SILVA, F. E. P. S.; NUNES, G. N. Detecção de microcistinas em amostras de água natural e potável. 56º Congresso Brasileiro de Química. Química: Tecnologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. Belém, Brasil. 2016.
4. BARBOSA, M. S. L.; MEDEIROS, I. J. S.; RIZZATTI, I. M.; **BECKER, M. M.**; **BECKER, M. M.**; TELES, V. L. G.; SOUSA FILHO, F.; LAU, P. F. R.; LIMA, R. C. P.; MEDRADO, E. S. Experimentação problematizadora no ensino de química: um levantamento acerca dos artigos publicados na revista Química Nova na Escola. 56º Congresso Brasileiro de Química. Química: Tecnologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. Belém, Brasil. 2016.
5. NUNES, G. S.; PESTANA, Y. M. R.; MANDAJI, C. M.; SOUTO, L. A. S.; **BECKER, M. M.** Impacto das atividades humanas em relação à presença de metais pesados em ambientes aquáticos - proposta de estudo com o rio Paciência em São Luís. 56º Congresso Brasileiro de Química. Química: Tecnologia, Desafios e Perspectivas na Amazônia. Belém, Brasil. 2016.
6. **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. F.; NUNES, G. S. Caracterização bromatológica de polpas de frutas da região amazônica. Workshop de Biotecnologia do Maranhão. São Luís, Brasil. 2016.
7. LOURENÇO, L. A.; MEDEIROS, I. J. S.; RIZZATTI, I. M.; **BECKER, M. M.**; **BECKER, M. M.**; SOUSA FILHO, F.; LAU, P. F. R. A concepção do conceito do princípio de *Le Chatelier* de estudantes em uma escola pública no município de Rorainópolis-RR ao analisar seus modelos mentais. 14º Simpósio Brasileiro de Educação Química. Manaus, Brasil. 2016.
8. MALTA, T. A.; NUNES, G. S.; **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M.; NUNES, G. S. Determinação da atividade antioxidante em frutos da Amazônia Legal e da Região Nordeste. 12º Congresso Norte Nordeste de Nutrição Parenteral e Enteral. Teresina, Brasil. 2016.
9. **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. de F.; NUNES, G. S. Potencial micromineral das amêndoas de monguba. Workshop de Biotecnologia "Integrando Regiões para o Conhecimento". São Luís, Brasil. 2017.
10. **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. de F.; NUNES, G. S. Avaliação do teor de vitamina C em frutos nativos Amazônicos. Workshop de Biotecnologia "Integrando Regiões para o Conhecimento", São Luís, Brasil. 2017.
11. **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M.; LIMA NETO, L. G.; BADEA, M.; NUNES, G.S.; PESTANA, M. R. Antioxidant Capacity of Natives Amazonian Fruits by Nitrotetrazolium Blue Chloride (NBT) method. 57º Congresso Brasileiro de Química. Megatendências: Desafios e oportunidades para o futuro da Química. Gramado, Brazil. 2017.
12. MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; OLIVEIRA, F.; NUNES, G.S. Determinação dos elementos minerais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e Zn em três variedades de

pimentões comercializados na cidade de São Luís-MA. 57º Congresso Brasileiro de Química. Megatendências: Desafios e oportunidades para o futuro da Química. Gramado, Brasil. 2017.

13. **BECKER, M. M.**; CATANANTE, G.; MARTY, J-L; NUNES, G.S. Mise en évidence des propriétés antioxydantes de fruits endémiques de la région Amazonienne par des tests colorimétriques miniaturisés. 6th Congrès des Doctorants. Perpignan, France. 2017.

14. **BECKER, M. M.**; CATANANTE, G.; MARTY, J-L; NUNES, G.S. Antioxidant activity assessment of exotic fruits by different analytical methods. 22th Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors. Montpellier, France. 2017.

15. **BECKER, M. M.**; RIBEIRO, E. B.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. F.; MARTY, J-L; NUNES, G. S. Determinação in situ do potencial antioxidante em vegetais por biossensores amperométricos. III Workshop de Biodiversidade e Biotecnologia do Maranhão. São Luís, Brasil. 2018.

16. **BECKER, M. M.**; RIBEIRO, E. B.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. F.; MARTY, J-L; NUNES, G. S. Plantas com potencial antioxidante e a multiplicidade de aplicações. III Workshop de Biodiversidade e Biotecnologia do Maranhão. São Luís, Brasil. 2018.

17. **BECKER, M. M.**; RIBEIRO, E. B.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. F.; MARTY, J-L; NUNES, G. S. Biossensores desenvolvidos pelo GEAA. II Semana do Meio Ambiente. São Luís, Brasil. 2018.

18. **BECKER, M. M.**; RIBEIRO, E. B.; MANDAJI, C. M.; MENDES, T. M. F. F.; MARTY, J-L; NUNES, G. S. Determinação in situ do potencial antioxidante em vegetais por biossensores amperométricos. II Semana do Meio Ambiente. São Luís, Brasil. 2018.

19. **BECKER, M. M.**; MENDES, T. M. F. F.; MARTY, J-L; NUNES, G. S.; CATANANTE. Amperometric biosensor for the evaluation of antioxidant capacity in fruits matrices. 28th Anniversary World Congress on Biosensors. Miami, USA. 2018.

20. **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M.; RIBEIRO, E. B.; SILVA, F. E. P. S.; NUNES, G. S. Aplicabilidade da PCA e HCA na discriminação de frutos Arecaceae. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

21. **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M.; RIBEIRO, E. B.; SILVA, F. E. P. S.; NUNES, G. S. Avaliação da presença do micromineral lítio no açaí proveniente de Boa Vista, Roraima, em relação à toxicidade e à essencialidade nutricional. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

22. MESQUITA, J. S.; MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; CHAGAS, V. T.; RAMOS, J. P.; NUNES, G. S. Determinação de compostos fenólicos em três frutos da Pré-Amazônia Maranhense. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

23. SILVA, F. E. P. S.; BLASQUES, R. V.; **BECKER, M. M.**; MORAES, J. F.; NUNES, G. S. Determinação de elementos traços na água e no sedimento do baixo curso da bacia Itapecuru-MA, Brasil. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

24. COSTA, N. B.; MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; NUNES, G.S. Determinação do potencial antioxidante o abricó (*Mammea americana*) empregando o método NBT. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

25. COSTA, N. B.; MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; NUNES, G.S. Determinação do potencial micromineral de murta (*Eugenia punicifolia*). 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

26. MESQUITA, J. S.; MANDAJI, C. M.; **BECKER, M. M.**; RAMOS, J. P.; FREITAS, A. S.; NUNES, G. S. Estudo do nível proteico, lipídico e avaliação do perfil energético em três frutos da Pré-Amazônia Maranhense. 58º Congresso Brasileiro de Química. Química, Sociedade e Qualidade de Vida. São Luís, Brasil. 2018.

Comunicação em Congressos na forma de Apresentação Oral

1. **BECKER, M. M.**; MALTA, T. A.; NUNES, G. S. Capacidade antioxidante de frutas nativas da região amazônica contra o radical superóxido pelo método NBT. Workshop de Biotecnologia do Maranhão. São Luís, Brasil. 2016.
2. **BECKER, M. M.**; CATANANTE, G.; MARTY, J-L; NUNES, G.S. Understanding the potential of antioxidants: how efficient? Which methods and applications? In: New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences. Journal of Medicine and Life. Bucharest: Editorial Office, v.10. Bucharest, Romania, 2017.

Minicursos ministrados em eventos científicos

1. Espectrometria de Emissão Óptica Induzida por Plasma (ICP-OES): Teoria e Prática. I Encontro Maranhense de Química Ambiental e V Ciclo de Palestras do NARP. NUNES, G. S.; **BECKER, M. M.**; LIMA, A. J. D. São Luís, Brasil, 2016.
2. Bioanalytical Methods for Determination of Antioxidant Capacity: Theory and Practice. 1ª Semana Acadêmica Integrada dos Cursos de Química, II Encontro Maranhense de Química Ambiental e VI Ciclo de Palestras do NARP. **BECKER, M. M.**; MARTY, J. L. São Luís, Brasil, 2018.

Artigos publicados

1. **BECKER, M. M.**; CHAGAS, V. T.; MARTY, J-L; MENDES, T. M. F. de F.; NUNES, G.S. Chemical variability in Amazonian palm fruits: açai (*Euterpe oleracea* Mart.), buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), and inajá [*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude] (Arecaceae). Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais, v. 13, n. 1, p. 67-77. 2018.
2. **BECKER, M. M.**; MANDAJI, C. M; CATANANTE, G.; MARTY, J-L; NUNES, G.S. Mineral, bromatological, antioxidant capacity and bioactive compounds assessment of native Amazon fruits. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 21. 2018.

Short Report publicado

1. **BECKER, M. M.**; RIBEIRO, D. B.; SILVA, F. E. P. S.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. NUNES, G. S. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 0, n. 0, p. 1-7. 2019.

Artigos em andamento

1. A sensitive xantine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in fruit samples. **BECKER, M. M.**; CATANANTE, G.; MARTY, J. L.; NUNES, G. S.
2. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Antiproliferative Activity of Ten Exotic Amazon Fruit. **BECKER, M. M.**; CATANANTE, G.; MARTY, J. L.; NUNES, G. S.

Patente Depositada :

NUNES, G. S.; **BECKER, M. M.**; MORAES, J. F.; MANDAJI, C. M.; SOUTO, L. A. S. Biossensor amperométrico para determinação da capacidade antioxidante, 2018. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201807511. Data de depósito: 04/12/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal do Maranhão.

RESUMO

O consumo de frutos tem sido incentivado não apenas por estes fornecerem nutrientes essenciais ao organismo humano, mas por serem fontes naturais em compostos bioativos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis. Considerando que a Amazônia brasileira possui uma imensa diversidade frutífera, mas escassas informações sobre suas propriedades nutricionais, antioxidantes e bioativas, este trabalho teve por objetivo caracterizar dez frutos nativos da região amazônica. A caracterização deu-se, inicialmente, por análises bromatológicas convencionais, seguidas da determinação dos minerais Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na e Zn por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES). Depois, seguiu-se à determinação da capacidade antioxidante dos frutos, empregando diferentes métodos colorimétricos (DPPH, ABTS e NBT), à avaliação da atividade antiproliferativa contra a linhagem celular de câncer de cólon humano (caco-2), à determinação de compostos bioativos (vitamina C e compostos fenólicos totais), e à caracterização da composição em compostos fenólicos, utilizando um sistema de Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado a espectrometria de massas de alta resolução. Considerando as desvantagens dos métodos convencionais para determinação da capacidade antioxidante, este trabalho objetivou ainda desenvolver um biossensor amperométrico utilizando como transdutor um sistema convencional de três eletrodos impressos em tela de PVC, contendo azul da Prússia (PB) como mediador eletroquímico. Inicialmente procedeu-se a otimização das condições de biofuncionalização da enzima xantina oxidase (XOD) com relação à razão XOD:PVA-AWP, ao tempo de irradiação sob a luz de néônio e à quantidade de XOD empregada em cada sensor. Depois, avaliou-se o desempenho analítico do biossensor, e finalmente procedeu-se à determinação da capacidade antioxidante de uma substância pura padrão e de extratos de frutos. Os resultados da caracterização bromatológica evidenciaram maiores conteúdos em lipídeos, proteínas e energia nas amostras de buriti, monguba e uxi. As amostras de abiu, açaí, bacuri, buriti, inajá, monguba, pajurá e uxi mostraram-se com elevado teor e/ou fonte em um ou mais minerais. Nas polpas de biribá e bacuri, observou-se elevada capacidade antioxidante lipofílica contra diferentes radicais livres, enquanto que os frutos de abiu, inajá e monguba apresentaram maior capacidade antioxidante hidrofílica. A atividade antiproliferativa dos frutos de biribá, inajá, monguba e pajurá levaram a uma inibição significativa no crescimento celular da linhagem de caco-2. A maioria das polpas se mostraram alimentos de alto teor em vitamina C, enquanto que os frutos biribá e pajurá foram classificados como fontes. Foram observadas maiores concentrações de compostos fenólicos lipofílicos na polpa de bacuri, enquanto que nas amostras de abiu, bacuri, inajá e monguba foram verificados maiores conteúdos fenólicos hidrofílicos. A avaliação da composição fenólica cromatográfica nos extratos de biribá, inajá e monguba quantificou um total de 11, 25 e 21 compostos, respectivamente, com atividades biológicas importantes. Os resultados fornecem informações que poderão contribuir para o melhor conhecimento da biodiversidade, bem como para o desenvolvimento da biotecnologia com vista a conservação do bioma Amazônico. No que concerne ao biossensor desenvolvido, as condições operacionais otimizadas foram: XOD:PVA-AWP de 1:2 v/v; tempo de exposição à luz de néônio de 30 min, e carga enzimática de 8 mU por eletrodo. O biossensor apresentou-se estável, com respostas rápidas, de fácil manuseio, de relativo baixo custo, elevada sensibilidade, baixos limites de detecção e de quantificação. A aplicabilidade do biossensor foi demonstrada pela análise *in vitro* do ácido gálico, tomado como antioxidante padrão, bem como de frutos amazônicos e não autóctones.

Palavras-Chaves: frutos amazônicos, composição mineral, capacidade antioxidante, compostos bioativos, biossensor amperométrico.

ABSTRACT

Fruit consumption has been encouraged not only by providing essential nutrients to the human body, but by being natural sources in bioactive compounds that promote health benefits and reduce the risk of developing chronic non-communicable diseases. Considering that the Brazilian Amazon has an immense fruitful diversity, but little information on its nutritional, antioxidant and bioactive properties, this work had the objective to characterize ten native fruits of the Amazon region. The characterization was initially by conventional bromatological analyzes, followed by the determination of the minerals Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na and Zn by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES). Afterward the antioxidant capacity of the fruits was evaluated using different colorimetric methods (DPPH, ABTS, and NBT), the evaluation of the antiproliferative activity against the human colon cancer cell line (caco-2), the determination of bioactive compounds (vitamin C and total phenolic compounds), and the characterization of the profile in phenolic compounds, using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to high resolution mass spectrometry. Considering the disadvantages of conventional methods for the determination of antioxidant capacity, this study aimed to develop an amperometric biosensor using as a transducer a conventional system of three screen printed electrodes on PVC, containing prussian blue (PB) as electrochemical mediator. In view of this, the conditions of biofunctionalisation of the xanthine oxidase enzyme (XOD) with respect to the XOD: PVA-AWP ratio, the irradiation time under the neon light and the amount of XOD used in each sensor were optimized. Afterwards, the analytical performance of the biosensor was evaluated, and the antioxidant capacity of a pure standard substance and fruit extracts was finally detected. The results of the bromatological characterization evidenced higher lipid, protein and energy contents in buriti, monguba and uxi samples. The samples of abiu, açaí, bacuri, buriti, inajá, monguba, pajurá and uxi were shown with high content and/or source in one or more minerals. In the pulps of biribá and bacuri, a high lipophilic antioxidant capacity was observed against different free radicals, whereas the fruits of abiu, inajá and monguba presented higher hydrophilic antioxidant capacity. The antiproliferative activity of the fruits of biribá, inajá, monguba and pajurá led to a significant inhibition in the cell growth of caco-2. The majority of the pulps were food of high vitamin C content, while the fruits biribá and pajurá were classified as sources. Higher concentrations of hydrophobic phenolic compounds were observed in the bacuri pulp, whereas in the abiu, bacuri, inajá and monguba samples, higher hydrophilic phenolic contents were verified. Analyzing the chromatographic composition of the extracts of biribá, inajá and monguba, it was possible to quantify a total of 11, 25 and 21 phenolic compounds, respectively, with important biological activities. The results provide information that may contribute to better understanding the Amazon biodiversity as well as the development of biotechnology for the conservation of the Amazon biome. As regards the developed biosensor, the optimized operating conditions were: XOD: PVA-AWP of 1: 2; time of exposure to the neon light of 30 min, and enzymatic loading of 8 mU per electrode. The biosensor was stable, with fast responses, easy automation, relatively low cost, high sensitivity, low detection and quantification limits. The applicability of the biosensor was demonstrated by the in vitro analysis of gallic acid, taken as standard antioxidant, as well as of Amazonian and non-autochthonous fruits.

Keywords: Amazonian fruits, mineral composition, antioxidant capacity, bioactive compounds, amperometric biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos amazônicos contemplados no presente estudo.	23
Figura 2 - Redução do oxigênio molecular à água durante a respiração aeróbica com a formação das EROs primárias, o potencial redox padrão para cada redução e as estruturas de Lewis (Adaptado de MAILLOUX, 2015).	31
Figura 3 - Equilíbrio entre compostos antioxidantes e as EROs (Adaptado de DAL; SIGRIST, 2016).	33
Figura 4 - Esquema de equações químicas envolvidas nos testes colorimétricos DPPH e ABTS (SINGH; SINGH, 2008; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).	36
Figura 5 - Esquema de equação química envolvida na medida da capacidade de sequestro do radical superóxido pelo método NBT (BECKER <i>et al.</i> , 2019).	37
Figura 6 - Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais (CALIL; SILVA, 2011).	38
Figura 7 - Esquema de biossensores mais utilizados e suas classificações conforme o componente biológico e o transdutor utilizado (Adaptado de SHAVANOVA <i>et al.</i> , 2016).	40
Figura 8 - Atividades biológicas conferidas aos compostos fenólicos naturais (Adaptado de LI <i>et al.</i> , 2014).	43
Figura 9 - Classificação dos compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007; HOLLMAN; KATAN, 1999).	44
Figura 10 - Esquema de equação proposta para o método Folin-Ciocalteu (PIRES <i>et al.</i> , 2017).	46
Figura 11 - Esquema do método de extração dos compostos antioxidantes, previamente à determinação do potencial antioxidante dos frutos.	58
Figura 12 - Esquema do método DPPH miniaturizado.	61
Figura 13 - Protocolo resumido do método SRB empregado.	65
Figura 14 - Sensor serigrafado.	69
Figura 15 - Mapa com a localização geográfica dos locais de coleta.	72
Figura 16 - Sazonalidade de frutificação dos frutos amazônicos sob estudo ao longo do ano.	73
Figura 17 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) utilizando 23 variáveis.	111
Figura 18 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 1 (PC1) e 3 (PC3) utilizando 23 variáveis.	112
Figura 19 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) utilizando 23 variáveis.	113
Figura 20 - Princípio de detecção do H ₂ O ₂ gerado pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina-oxidase (HX/XOD), usando o biossensor amperométrico.	117
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono na ausência/presença de mediador de PB. Medidas eletroquímicas realizadas em solução tampão K-PBS 50	

mmol L ⁻¹ (pH 7,5) com KCl 10 mmol L ⁻¹ a uma taxa de varredura de 50 mVs ⁻¹ vs Ag/AgCl.....	118
Figura 22 - Resposta do biossensor amperométrico com a adição sucessiva de HX em diferentes potenciais. A eficiência analítica é evidenciada.	119
Figura 23 - Diagrama de Pareto representando a análise de ANOVA para componentes lineares dos parâmetros avaliados. Resultados significativos para p > 0,05.....	123
Figura 24 - Diagramas de superfícies de respostas mostrando correlações entre: (A) razão enzima:polímero (R _{XP}) com a carga enzimática (C _{xod}); (B) tempo de foto polimerização (T _p) com a carga enzimática (C _{xod}), e (C) razão enzima:polímero (R _{XP}) com o tempo de foto polimerização (T _p).....	124
Figura 25 - Respostas cronoamperométricas do biossensor em diferentes concentrações do substrato hipoxantina (HX), destacando sua faixa linear (1,0-75 µmol L ⁻¹).	130
Figura 26 - Carta de controle estatístico para monitoramento e identificação de variações no decorrer dos ensaios cronoamperométricos com o mesmo biossensor (n=10)....	131
Figura 27 - Intensidade da corrente gerada no sistema biossensor, em função da concentração de HX adicionada, na ausência e presença do ácido gálico, em diferentes concentrações.....	133
Figura 28 - Capacidade antioxidante do ácido gálico, em função da sua concentração, determinada pelo sistema biossensor.....	133
Figura 29 - Efeito antioxidante dos néctares de polpas comerciais de frutos amazônicos. Resposta do biossensor amperométrico em função de sucessivas adições do substrato hipoxantina (HX), na ausência e presença das amostras.....	135
Figura 30 - Efeito antioxidante dos refrescos de frutos não autóctones. Resposta do biossensor amperométrico em função de sucessivas adições do substrato hipoxantina (HX), na ausência e presença das amostras.	136
Figura 31 - Capacidade antioxidante dos néctares dos frutos amazônicos avaliados pelo biossensor desenvolvido.	138
Figura 32 - Capacidade antioxidante dos refrescos dos frutos não autóctones avaliados pelo biossensor desenvolvido.	138
Figura A1 - Esquema de funcionamento e componentes típicos do sistema de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (Adaptado de DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH et al., 2013).....	172
Figura A2 - Esquema da tocha e plasma formado usado em ICP OES (Adaptado de DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH <i>et al.</i> , 2013).	172
Figura A3 - Representação esquemática de um sistema para CLAE: (1) reservatório da fase móvel; (2) degaseificador de solventes; (3) válvula de gradiente; (4) reservatório misturador; (5) bomba de alta pressão; (6) válvula de comutação; (7) injetor da amostra; (8) pré-coluna (coluna de proteção); (9) coluna analítica; (10) detector; (11) processador de dados; (12) recipiente de coleta (Produzido por Yassine Mrabet).	175
Figura B1 - Fotos do liofilizador utilizado no pré-preparo das amostras.	177
Figura B2 - Fotos do forno micro-ondas usado na extração dos minerais das amostras de frutos amazônicos. Destaque dado ao carrossel contendo os vasos de Teflon.	178

Figura B3 - Fotos do Espectrofotômetro Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).	179
Figura B4 - Foto do Sistema de Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) (LABBULLETIN, 2019).	180
Figura B5 - Fotos do Potenciostato, com destaque para o conector feito sob encomenda para acoplamento do biossensor.	181
Figura B6 - Fotos da máquina de serigrafia, no momento da produção de sensores eletroquímicos (eletrodos), a partir da deposição sucessiva de camadas de tinta e pastas de grafite e Ag/AgCl, sobre um placa fina de PVC.	182
Figura B7 - Esquema de deposição das camadas do sensor eletroquímico, formando os três eletrodos, empregando-se a máquina de serigrafia.	182
Figura B8 - Foto do esquema de liofilização das amostras de frutos e armazenamento a vácuo das amostras liofilizadas.	183

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações agronômicas, de classificação e de localização da amostragem dos frutos amazônicos estudados	54
Tabela 2 - Programa de digestão em forno micro-ondas.....	56
Tabela 3 - Condições experimentais de operação do ICP OES.....	56
Tabela 4 - Sequência de adição de reagentes para o método DPPH	60
Tabela 5 - Sequência de adição de reagentes para o método ABTS	62
Tabela 6 - Sequência de adição de reagentes para o método NBT.....	62
Tabela 7 - Sequência de adição de reagentes para o método Folin-Ciocalteu	66
Tabela 8 - Caracterização físico-química dos frutos <i>in natura</i>	75
Tabela 9 - Teores minerais nos frutos amazônicos estudados e figuras de mérito do método analítico empregado.....	78
Tabela 10 - Valores da ingestão diária recomendada (IDR) em minerais para um adulto saudável	79
Tabela 11 - Capacidade antioxidante (IC ₅₀) dos diferentes extratos dos frutos amazônicos ...	88
Tabela 12 - Resultados da viabilidade celular anticâncer promovida pelos extratos dos frutos amazônicos	92
Tabela 13 - Teores de vitamina C encontradas nos frutos amazônicos analisados	95
Tabela 14 - Teores de compostos fenólicos totais dos frutos amazônicos, obtidos nos diferentes extratos.....	97
Tabela 15 - Perfil cromatográfico qualitativo de compostos fenólicos identificados através do tempo de retenção dos padrões correspondentes, usando diferentes métodos analíticos	104
Tabela 16 - Quantificação de compostos fenólicos em amostras selecionadas de frutos amazônicos	107
Tabela 17 - Correlação entre os resultados obtidos para os compostos bioativos, a capacidade antioxidante e a atividade antiproliferativa para os frutos amazônicos estudados	114
Tabela 18 - Eficiência analítica do biossensor em diferentes potenciais de trabalho, expressa em sensibilidade e linearidade	119
Tabela 19 - Análise de ANOVA para o estudo de otimização da imobilização enzimática em relação aos fatores C _{XOD} , R _{XP} e T _P	122
Tabela 20 - Eficiência analítica do biossensor eletroquímico desenvolvido.....	128

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividades químicas e biológicas dos frutos estudados	23
Quadro 2 - Descrição resumida dos métodos bromatológicos empregados	55
Quadro 3 - Estruturas química e classificação dos compostos fenólicos monitorados	99

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ABTS: 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)

AOAC: do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

CAS: do inglês *Chemical Abstract Service*

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CV: coeficiente de variação

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EDTA: do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs: Espécies Reativa de Oxigênio

etOH: extratos etanólicos

FAO: do inglês *Food and Agriculture Organization* (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas)

HAT: do inglês *Hydrogen Atom Transfer* (mecanismo baseado na transferência de hidrogênio)

HCA: do inglês *Hierarchical Cluster Analysis* (Análise de Agrupamentos Hierárquicos)

HX: hipoxantina

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

IC₅₀: concentração da amostra capaz de inibir 50% do sinal gerado pelo seu alvo

ICP-OES: do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)

IDR: Ingestão Diária Recomendada

K-PBS: solução tampão de fosfato salino de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo EDTA (0,1 mmol L⁻¹)

LOD: do inglês *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LOQ: do inglês *Limit of Quantification* (Limite de Quantificação)

m: Inclinação da curva analítica

MIRR: Museu Integrado de Roraima

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

NBT: do inglês *nitroblue tetrazolium* (nitroazul de tetrazólio)

ND: Não Determinado

PB: do inglês *Prussian Blue* (azul da Prússia)

PBS: solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH=7,4)

PBS:etOH: extrato hidroetanólico (1:1)

PCA: do inglês *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

PVA-AWP: do inglês *Poly(Vinyl Alcohol) Azide-unit pendant Water-soluble Photopolymer*
(álcool polivinílico hidrossolúvel)

PVC: policloreto de vinila

s: desvio padrão amostral

s_{br}: desvio padrão do sinal do branco das amostras

S_{br}: desvio padrão do sinal do branco dos padrões

SET: do inglês *Single Electron Transfer* (mecanismo baseado na transferência de um elétron)

SOD: superóxido dismutase

SRB: sulforodamina B

UV-VIS: região do ultravioleta-visível

XA: xantina

XOD: xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Frutos Amazônicos	21
2.2 Minerais	28
2.2.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)	29
2.3 Oxidantes e Antioxidantes	30
2.3.1 Determinação da capacidade antioxidante	34
2.3.1.1 Métodos colorimétricos	35
2.3.1.2 Biossensores amperométricos enzimáticos	38
2.4 Compostos Fenólicos	43
2.4.1 Determinação de compostos fenólicos	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. JUSTIFICATIVA	48
5. MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1 Reagentes e Demais Materiais	51
5.2 Equipamentos	52
5.3 Caracterização de Frutos da Região Amazônica	53
5.3.1 Amostras e amostragem	53
5.3.2 Caracterização bromatológica	55
5.3.3 Determinação dos teores de minerais	55
5.3.4 Determinação da capacidade antioxidante	58
5.3.4.1 Método DPPH	59
5.3.4.2 Método ABTS	60
5.3.4.3 Método NBT	62
5.3.5 Testes de viabilidade celular anticâncer	63
5.3.6 Compostos bioativos	64
5.3.6.1 Determinação do teor de ácido ascórbico (Vitamina C)	64
5.3.6.2 Determinação de compostos fenólicos	66
5.3.6.2.1 Método Folin-Ciocalteu	66
5.3.6.2.2 Análises cromatográficas	67
5.3.7 Análises quimiométricas	68

5.4 Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Determinação da Capacidade Antioxidante	68
5.4.1 Sensor serigrafado.....	68
5.4.2 Imobilização enzimática e otimização	69
5.4.3 Princípio do biossensor e medições amperométricas	70
5.4.4 Análise de amostras reais e antioxidante de referência	71
5.4.5 Caracterização eletroquímica e eficiência analítica do biossensor	71
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.1 Caracterização dos Frutos Amazônicos Estudados	72
6.1.1 Caracterização bromatológica dos frutos	74
6.1.2 Composição mineral dos frutos	77
6.1.3 Capacidade antioxidante dos frutos amazônicos	87
6.1.4 Viabilidade celular anticâncer apresentada pelos frutos	91
6.1.5 Presença de compostos bioativos nos frutos	95
6.1.5.1 Vitamina C.....	95
6.1.5.2 Compostos fenólicos	96
6.1.6 Resultados das análises de correlações quimiométricas	110
6.2 Desenvolvimento de um Biossensor: Determinação Rápida da Capacidade Antioxidante	115
6.2.1 Caracterização eletroquímica do biossensor.....	116
6.2.2 Otimização do processo de imobilização enzimática	121
6.2.3 Eficiência do biossensor amperométrico	127
6.2.4 Aplicação do biossensor	132
6.2.4.1 Validação da resposta do biossensor pelo antioxidante ácido gálico	132
6.2.4.2 Determinação da capacidade antioxidante de amostras reais	135
7. CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS	143
ANEXO A	172
ANEXO B	177

1. INTRODUÇÃO

A região amazônica brasileira é um complexo mosaico de áreas endêmicas com rica diversidade de espécies animais e vegetais distribuídas em concordância com as especificidades de sua biota (SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005). Possui grande biodisponibilidade de espécies nativas da flora brasileira com cerca de 220 espécies de plantas frutíferas comestíveis catalogadas o que representa 44% da diversidade em frutos nativos no Brasil (NEVES *et al.*, 2012). Mas apesar da reconhecida biodiversidade, a fruticultura amazônica pouco contribui para o protagonismo do Brasil como terceiro maior produtor mundial em frutas (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2015). Além disso, a realidade social, econômica e o perfil nutricional da população, registrado na região, contrastam fortemente com a sua riqueza em recursos biológicos (AGUIAR, 2006a).

Os frutos são reconhecidos por serem fontes de diversos nutrientes, sendo, portanto, alimentos importantes para a dieta humana. Tais alimentos têm recebido maior atenção nos últimos anos, devido às evidências epidemiológicas de que o consumo regular de vegetais reduz a mortalidade e morbidade causadas por algumas doenças crônicas (ALISSA; FERNS, 2012; RUFINO *et al.*, 2010). Este efeito protetor tem sido atribuído à presença de minerais e fitoquímicos com propriedades antioxidantes (KOZLOWSKA; SZOTASK-WEGIEREK, 2014; WANG *et al.*, 2013; LIU, 2013; KAHL *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2011).

Antioxidantes são compostos sintéticos ou naturais capazes de prevenir ou retardar o dano oxidativo causado por fontes oxidantes, em especial as espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem oxidar biomoléculas celulares como proteínas, membranas e DNA e, consequentemente, levar ao desenvolvimento e progressão de várias patologias, como câncer, aterosclerose, Parkinson, Alzheimer e outras doenças graves (RAHMAN *et al.*, 2012; HALLIWELL, 2012; FLORA, 2009).

Na maioria dos casos, os antioxidantes derivados de produtos naturais apresentam problemas de estabilidade, em virtude da presença de insaturações em sua estrutura química, que os tornam sensíveis à exposição ao calor, à luz e à presença de oxigênio (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Neste sentido, verifica-se a necessidade de métodos analíticos que realizem a medição da capacidade antioxidante no local da coleta dos frutos, a fim de minimizar as perdas desses compostos.

Métodos espectrofotométricos, eletroquímicos e cromatográficos têm sido utilizados para medir a capacidade antioxidante, diferindo no mecanismo de geração de diferentes

espécies oxidantes e/ou moléculas alvo e na forma como os produtos finais são medidos (PISOSCHI; NEGULESCO, 2011). Nos últimos anos, porém, a literatura tem apontado para o emprego de biossensores eletroquímicos como ferramentas promissoras na determinação do potencial antioxidante, devido a determinadas características, tais como seletividade, baixo custo de obtenção, facilidade de estocagem, capacidade de miniaturização, fácil automação e portabilidade, que combinadas possibilitam a análise *in situ* (LATES; MARTY; POPESCU, 2011; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

Considerando a importância dos frutos para a região amazônica e o potencial de algumas espécies frutíferas nativas ainda pouco exploradas, este trabalho teve como objetivos iniciais caracterizar química e bromatologicamente dez frutos genuinamente amazônicos, bem como determinar sua capacidade antioxidante e sua viabilidade celular antitumoral. Tendo em vista as limitações inerentes aos métodos analíticos convencionais, este trabalho objetivou, por fim, desenvolver uma nova ferramenta analítica baseada em um biossensor amperométrico para determinação da capacidade antioxidante de amostras reais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, serão apresentadas informações sobre os frutos contemplados, tais como seus aspectos morfológicos, aplicações na medicina popular e principais investigações científicas sobre suas propriedades biológicas. Além disso, será apresentada uma abordagem nutricional em relação à presença de compostos bioativos, bem como às técnicas analíticas utilizadas para determiná-los. Um enfoque especial será dado ao desenvolvimento de biossensores amperométricos voltados para a determinação da capacidade antioxidante em amostras vegetais.

2.1 Frutos Amazônicos

A bacia amazônica abriga a maior floresta tropical do mundo, compreendendo cerca de 611 milhões de hectares distribuídos entre nove países da América do Sul: Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Destes, aproximadamente 370 milhões de hectares compreendem áreas de floresta em que 60% estão localizados em território brasileiro (RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011).

Os dados sobre a biodiversidade são bastante expressivos. Estima-se que a região abrigue um terço do estoque genético da terra, com mais de 60.000 espécies de plantas (IBAMA, 2016).

A Floresta Amazônica apresenta diversas espécies vegetais nativas com potencial alimentício e farmacológico ainda desconhecido, que estão sendo ameaçadas de extinção pela destruição da floresta, que selecionou e adaptou estes vegetais durante anos às condições de clima e de solo da região (HIGUCHI; HIGUCHI, 2004).

Os frutos são uma das fontes mais ricas de nutrientes e suplementos antioxidantes, nos quais estudos epidemiológicos confirmam que o seu consumo está associado a uma menor incidência de certos cânceres, bem como efeitos benéficos sobre doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e catarata (SINDHI *et al.*, 2013; HAMID *et al.*, 2010; STEINMETZ, POTTER, 1996). Os mecanismos de ação dos nutrientes e compostos bioativos presentes nesses alimentos, como minerais, vitaminas e compostos antioxidantes sustentam essa valorização (SANTOS; LIMA, 2008).

Estudos químicos e farmacológicos, *in vitro* e *in vivo*, têm sido reportados na literatura a fim de melhor compreender o potencial nutracêutico e os benefícios antioxidantes de frutos nativos da região Amazônica.

A Figura 1 apresenta os dez frutos amazônicos que foram contemplados nesse trabalho e seus respectivos nomes comuns e científicos, e a Quadro 1, informações sobre trabalhos que avaliaram as atividades biológicas de diferentes extratos e porções dos frutos contemplados neste estudo.

Dentre os frutos, algumas espécies possuem sabores amplamente apreciados por consumidores brasileiros e estrangeiros, enquanto outras como abiu, bacuri, biribá, inajá, monguba, pajurá e uxi são consumidos especialmente pela população local e povos indígenas, e poucas são as informações em relação aos constituintes químicos, principalmente em relação a elementos minerais, capacidade antioxidante, compostos bioativos e o potencial antiproliferativo em células cancerígenas.



Figura 1 - Frutos amazônicos contemplados no presente estudo.

Quadro 1 - Atividades químicas e biológicas dos frutos estudados

Fruto	Tecido	Atividade química/biológica	Referência
Abiu	Polpa	Capacidade antioxidante	CANUTO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa		GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010
	Folha		CASTRO <i>et al.</i> , 2006
	Folha	Atividade antimalárica	PÉREZ, 2002
	Folha	Potencial no tratamento de diabetes	SOUZA <i>et al.</i> , 2012
Açaí	Casca e polpa	Capacidade antioxidante	NEVES <i>et al.</i> , 2012
	Polpa		CANUTO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa		RUFINO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa	Atividade antiproliferativa em linhagem celular de colorretal HT 29	PACHECO-PALENCIA <i>et al.</i> , 2008
	Polpa	Atividade antiproliferativa em células de glioma de cérebro	HOGAN <i>et al.</i> , 2010
	Semente	Efeito vasodilatador	ROCHA <i>et al.</i> , 2007
	Semente	Potencial anti-hipertensivo	COSTA <i>et al.</i> , 2012
	Polpa		GALE <i>et al.</i> , 2014
	Polpa		SHAUSS <i>et al.</i> , 2006
	Polpa	Atenuação do desenvolvimento da carcinogênese química de cólon	FRAGOSO <i>et al.</i> , 2013

Continuação Quadro 1...

Bacuri	Polpa		CANUTO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa	Capacidade antioxidante	RUFINO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa		GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010
	Semente		COSTA JÚNIOR, <i>et al.</i> , 2013
	Semente	Atividade leishmanicidas e genotóxica em células de fibroblastos de pulmão	
	Semente	Ação antiepiléptica	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2011
Biribá	Semente	Cicatrizante	SANTOS JUNIOR <i>et al.</i> , 2010
	Casca	Capacidade antioxidante	YAMAGUCHI, 2015
	Polpa		BARREIROS; BARREIROS, 2011
	Semente	Propriedades inseticidas	MASSAROLLI; PEREIRA; FOERSTER, 2016
	Folhas e sementes	Atividade antileishmania	LIMA <i>et al.</i> , 2012
Buriti	Polpa	Capacidade antioxidante	KOOLEN <i>et al.</i> , 2013
	Polpa		CANUTO <i>et al.</i> , 2010
	Polpa		GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010
	Casca e polpa		OLIVEIRA, 2017
	Polpa	Fotoprotetor contra radiação UVA e UVB	ZANATTA <i>et al.</i> , 2010
	Casca	Ação antitrombótica	FUENTES <i>et al.</i> , 2013
	Polpa	Atividade antimicrobiana	KOOLEN <i>et al.</i> , 2013
	Folhas	Efeitos antitumorais	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2014
	Polpa		CANUTO <i>et al.</i> , 2010
Cupuaçu	Semente	Capacidade antioxidante	YANG <i>et al.</i> , 2003
	Polpa		GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010
	Semente		YANG <i>et al.</i> , 2003
	Semente	Atividade antiproliferativa em linhagem celular de câncer de cólon HCT-116 e SW-480	
Inajá	Casca e polpa	Capacidade antioxidante	NEVES <i>et al.</i> , 2012
	Polpa	Ação inibitória de acetilcolinesterase	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2016
Monguba	Semente	Capacidade antioxidante	BARBOSA, 2016
	Casca	Efeito hipoglicemiante	CETTO; HEINRICH, 2005
	Pedúnculo	Potencial anti-inflamatório	CHENG <i>et al.</i> , 2017
Pajurá	Casca, polpa e semente		BERTO <i>et al.</i> , 2015b
	Casca, polpa e semente	Capacidade antioxidante	SOUZA, 2016
	Polpa		MASSING <i>et al.</i> , 2018
Uxi	Casca e polpa		NEVES <i>et al.</i> , 2012
	Casca do tronco	Capacidade antioxidante	SILVA; TEIXEIRA, 2015
	Polpa		GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010
	Casca do tronco		SILVA; TEIXEIRA, 2015
		Ação antibacteriana Efeito inibitório de colinesterases Potencial antidiabético	
	Polpa	Potencial para o tratamento de diabetes	GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010

O abiu (*Pouteria caimito*) é uma baga que possui uma casca lisa de 3 a 5 mm de espessura e contém um látex que é depreciado pelo consumidor. Quando maduro, o fruto é amarelo brilhante, com formato elipsoidal a esférico, 6 a 10 cm de diâmetro e 100 a 600 g em massa. O mesocarpo é macio, gelatinoso, com 1 a 5 sementes castanhas escuras. O abiu é consumido *in natura*, especialmente pela população local, e têm despertado o interesse da fruticultura mundial por ser promissor na forma de sucos, iogurtes, saladas de frutas, geleias e sorvetes (YUYAMA *et al.*, 2013; LIM, 2006; FALCÃO; CLEMENT, 1999). Na medicina tradicional, todas as partes do abiuzeiro são utilizadas no tratamento de doenças, com efeitos adstringente, emoliente, hipoglicemiante, fungicida e anti-inflamatório (RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Atividades biológicas da polpa do abiu, porção convencionalmente comestível, ainda são escassas na literatura científica, sendo encontradas informações especialmente sobre o extrato das folhas (Quadro 1).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma drupa globosa ou levemente depressa, com diâmetro variando de 1 a 2 cm e pesando, em média, 1,5 g. O mesocarpo, com cerca de 1 mm de espessura, é polposo e envolve um endocarpo volumoso e duro. A polpa dos frutos, após processamento, é consumida pura ou acompanhada de farinha de mandioca, tapioca, peixe ou camarão, sendo ainda utilizada na fabricação de sucos, sorvetes, geleias e vinho de açaí (BRASIL, 2015). De acordo com a adição de água no processo de despulpamento, a polpa de açaí pode ser classificada como açaí especial ou tipo A quando possuir teor de sólidos totais superiores a 14%, açaí tipo B (11 a 14%) e tipo C (8 a 11%) (BRASIL, 1999). O consumo da polpa encontra-se em franca expansão no país e no mercado internacional, em que é classificado como uma superfruta por sua capacidade funcional e nutritiva tendo em vista o elevado conteúdo energético, de fibras, proteínas, vitamina E, minerais e ácidos graxos essenciais (SOUZA *et al.*, 2011; RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011). Estudos vêm revelando o potencial da inclusão do açaí na dieta alimentar como alimento funcional, devido sua capacidade antioxidante aliado aos benefícios nutricionais e terapêuticos, incluindo a ação antiproliferativa, anti-inflamatória e o efeito anti-hipertensivo (Quadro 1).

Os frutos de bacuri (*Platonia insignis*) possuem formato variável, com diâmetro médio de 4 a 5 cm e 5 a 6 cm comprimento. Dentro da casca dura há uma polpa branca, aromática e cremosa com 3 a 4 sementes grandes. A maior parte da safra de bacuri do Brasil é consumida fresca, sendo comercializada na região cultivada ou proximidades, onde há um processamento industrial ainda limitado para produção de sorvetes, sucos e geleias (MANICA, 2000). A polpa, a casca e a resina são utilizados na medicina tradicional como digestivos, diuréticos,

antiescorbúticos e cicatrizantes (RIOS, PASTORE JUNIOR, 2011; REVILLA, 2002), enquanto o óleo das sementes tem sido usado para o tratamento de diarreia, problemas de pele, dores de ouvido, picadas de aranhas e cobras, reumatismos, artrites e como cicatrizante (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Um aumento em estudos envolvendo as propriedades químicas, biológicas e farmacológicas da semente de bacuri pode ser observado na literatura recente (Quadro 1). No entanto, as atividades relacionadas a polpa ainda são insuficientes.

O biribá (*Rollinia ortophetala* sinônimo heterotípico de *Annona mucosa*) é um fruto esférico e grande, que mede de 5 a 15 cm de largura, com protuberâncias ligeiras ou muito proeminentes. Quando completamente maduro possui cor verde-amarelada. A polpa é esbranquiçada, suculenta, aromática e saborosa, com uma textura cremosa e um delicioso equilíbrio agridoce. Seu consumo é apreciado, especialmente *in natura*, pela população amazônica, como também na forma de sucos e vinhos após a fermentação (COSTA; MULLER, 1995). O popular uso terapêutico das folhas tem sido registrado em tratamentos para a cura de tumores e reumatismo e como anti-inflamatório em artrites, enquanto os frutos são usados para auxiliar a coagulação sanguínea, como analépticos e antiescorbúticos (RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011; AQUINO, 2008; AGUIAR, 2006b). Escassos são os dados disponíveis na literatura sobre os compostos bioativos e as atividades biológicas da polpa do biribá.

Os frutos do buriti (*Mauritia flexuosa*) são subglobosos a elípticos, variam de 4 a 5 cm de diâmetro e são recobertos por escamas marrom-avermelhadas. O mesocarpo é suave e sua cor varia de laranja a laranja avermelhado. O buritizeiro é uma planta extremamente versátil, servindo como alimento animal e humano, combustível, medicinal, ornamental, entre outros usos (RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011). Na medicina popular, o fruto é utilizado como antigripal e em deficiências de vitamina A (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011). O fruto do buriti é classificado como um alimento funcional em virtude da sua composição nutricional, especialmente nas porções da polpa e no óleo, por conter compostos bioativos que conferem, entre outros, ação antioxidante e anti-inflamatória (FREIRE *et al.*, 2016). Nessa perspectiva, é imprescindível a ampliação da pesquisa e do conhecimento sobre novas atividades biológicas da polpa do buriti.

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore de grande porte cujos frutos possuem polpa branco-amarelada. A polpa tem um sabor forte e é muito apreciada pelas comunidades locais e também no mercado internacional como ingrediente em sucos, bebidas, sorvetes, geleias e doces (PUGLIESE, 2010). Na medicina tradicional, extratos da casca e folhas de árvores são utilizados no tratamento de bronquite, diarreia e nefrite, enquanto a polpa

e as sementes apresentam potencial antioxidante com teores importantes em flavonóides (TELES, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2003).

Os frutos de inajá (*Maximiliana maripa*) são marrons, oblongo-elipsoides, com 4 a 5 cm de comprimento e 2,5 a 3 cm de diâmetro. O mesocarpo possui a camada externa fibrosa, sendo a interna carnuda, com 0,3 a 0,5 cm de espessura e sementes presentes em um número de 1 a 3. A palmeira de inajazeiro normalmente produz de 5 a 6 cachos por ano, com 800 a 1000 frutos por cacho. A polpa do fruto é consumida *in natura* ou na forma de mingau, sendo utilizada na medicina tradicional para o fortalecimento de pessoas debilitadas (SHANLEY; SERRA; MEDINA, 2010). A amêndoa, assim como a polpa do fruto podem servir como matéria-prima para indústria de cosméticos e saboarias, podendo o óleo obtido da amêndoa alcançar um rendimento de até 60% (MIRANDA *et al.*, 2001). O inajá é um fruto ainda pouco apreciado, possivelmente devido à insuficiência de pesquisas e consequente desvalorização desta espécie vegetal (BEZERRA, 2011; VILLACHICA, 1996).

Os frutos de monguba (*Pachira aquatica*) apresentam sementes comestíveis com características organolépticas apreciadas, embora seja uma planta usada principalmente para arborização. O fruto tem formato oblongo-elipsoide, com 20 a 30 cm de comprimento e 10 a 12 cm de diâmetro, pesa de 1 a 1,5 Kg e possui de 10 a 25 sementes de formato irregular (FAO, 1986). As sementes são consumidas pela população local *in natura*, cozidas, torradas ou ainda na forma de farinha. No entanto, Oliveira *et al.* (2000) demonstraram que as sementes *in natura* apresentaram toxicidade a ratos, possivelmente devido à presença de lectinas e inibidores de tripsinas e, portanto, tais fatores antinutricionais podem limitar seu interesse. Embora seja de fácil cultivo e suas sementes apresentem grandes rendimentos em óleo, a monguba é um fruto ainda subutilizado por brasileiros e dados sobre sua composição química e potencial industrial são escassos (SILVA; BORA; AZEVEDO, 2010).

Os frutos de pajurá (*Couepia bracteosa*) são drupas globosas de 8 a 12 cm de comprimento e 8 a 15 cm de diâmetro e que pesam de 80 a 200 g. O exocarpo é castanho escuro com uma superfície áspera ao tato devido inúmeras lenticelas presentes. O mesocarpo é espesso, carnudo, de cor amarelo-acastanhado, com uma consistência granulosa e um sabor adocicado. A polpa é tradicionalmente consumida *in natura* e na preparação de doces (BERTO *et al.*, 2015b). Existem poucos estudos sobre o pajurá na literatura, em que suas abordagens estão relacionadas principalmente a aspectos fenológicos e ecológicos (FALCÃO; LLERAS; KERR, 1981). Em se tratando das atividades biológicas do fruto, apenas registros da capacidade antioxidante foram encontrados, e em relação a composição nutricional há poucos e recentes

trabalhos os quais foram utilizados neste estudo como comparação, apesar da complexidade envolvida (MASSING *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2016; BERTO *et al.*, 2015a; BERTO *et al.*, 2015b).

O fruto do uxizeiro (*Endopleura uchi* basônimo *Saccoglotis uchi*) é uma drupa elipsoide, com peso variando entre 50 a 70 g e um exocarpo liso, verde-amarelado ou pardo-escuro quando maduro. O mesocarpo possui em média 5 mm de espessura, com aspecto carnosos farináceo e oleoso. É consumido *in natura* especialmente pela população indígena, sendo também usado na elaboração de refrescos, cremes, doces, licores, sorvetes, vinhos e óleos (RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011; SHANLEY; MEDINA, 2005; FAO, 1986). Na medicina popular, chás das cascas são usados como anti-inflamatório no combate às inflamações uterinas, miomas e ovários policísticos (REVILLA, 2002), no tratamento de artrite, reumatismo, colesterol alto e diabetes (SHANLEY; GAIA, 2004; CORRÊA, 1984). Talvez, por este motivo, os estudos na literatura sobre as atividades biológicas do uxi sejam limitados à porção da casca em que as atividades antimicrobianas (POLITI *et al.*, 2011) e imunológicas (MOREIRA *et al.*, 2007) foram demonstradas.

2.2 Minerais

Os minerais são originários da decomposição de rochas, minérios, vegetais e animais e são metabolizados pelas plantas através da absorção destes no ambiente (solo, água e ar) onde se desenvolvem. Deste modo, os minerais chegam ao homem pela cadeia alimentar, principalmente através do consumo de frutas e hortaliças (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Minerais essenciais são nutrientes indispensáveis ao organismo humano que desempenham função plástica, catalítica e reguladora, atuando na formação e ação das células de defesa do organismo e enzimas antioxidantes; na estrutura dos tecidos corpóreos como ossos, dentes e músculos; na ativação-regulação de enzimas; na regulação dos balanços hídrico, ácido-base e da pressão osmótica; no controle de impulsos nervosos, da atividade muscular e do transporte de oxigênio (BIASEBETTI, RODRIGUES; BAZUR, 2018; AZEVEDO; CHASIN, 2003).

O consumo mínimo/máximo admitido de minerais no organismo humano, a fim de prevenir deficiências que impeçam o seu bom funcionamento e de evitar a toxidez, definem a quantidade de minerais requeridas. Assim, a ingestão recomendada de minerais depende da fase de crescimento, das condições fisiológicas (gravidez e lactação), do estado nutricional e da

saúde do organismo vivo, bem como das exigências fisiológicas devido à prática de exercícios físicos (KINUPP; BARROS, 2008; FRANCO, 2005, SHILS; OLSON; SHIKE, 1994).

O conhecimento da concentração de minerais em frutos é importante para profissionais da saúde e para os consumidores em geral, pois indicam constituintes que, devido sua essencialidade e/ou toxicidade, influem na saúde humana. Além disso, são informações úteis para profissionais das áreas agrônômicas e do meio ambiente por estarem relacionadas à saúde e produtividade do vegetal.

Diferentes técnicas analíticas podem ser empregadas para a determinação de minerais nos mais variados tipos de amostras, tais como a espectrometria atômica (absorção ou emissão) e a espectrometria de massas. No entanto, àquelas baseadas em espectrometria atômica são as mais amplamente empregadas.

2.2.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

A técnica de análise química instrumental ICP OES constitui uma ferramenta analítica utilizada na determinação elementar quantitativa e qualitativa em uma ampla variedade de amostras, tais como materiais biológicos, ambientais, geológicos, tecnológicos e alimentos (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

A ICP OES abrange uma ampla série de elementos metálicos e possui as seguintes vantagens: baixas interferências, bons espectros de emissão, bons limites de detecção, análise multielementar e ampla faixa linear de trabalho. Por outro lado, envolve um elevado custo, especialmente na manutenção do equipamento e suprimento de gás (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

Os componentes básicos do ICP OES incluem um sistema de nebulização, sistema de atomização (plasma), dispositivo isolador de comprimentos de ondas, transdutor(es) de radiação, processador de sinal e sistema computacional. A Figura A1 do Anexo A apresenta o esquema da técnica, os principais componentes do sistema ICP OES e uma breve explanação sobre o funcionamento do equipamento. Um plasma, por definição, é uma mistura gasosa condutiva contendo uma concentração significativa de cátions e elétrons, com uma carga total próxima de zero (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013), o qual é formado e mantido por um fluxo de gás de argônio em um campo magnético de alta frequência em uma tocha de quartzo, constituída de três tubos concêntricos, conforme o esquema apresentado na Figura A2 Anexo A e as explicações adicionais do mesmo anexo.

Para as determinações quantitativas torna-se necessária, inicialmente, a construção da curva analítica do elemento metálico a ser quantificado, onde são determinadas as intensidades de emissões de soluções padrões em concentrações crescentes, conhecidas e dentro da faixa da concentração do analito na amostra. Os resultados são plotados em um gráfico de intensidade de emissão em função da concentração, devendo ser linear e com um coeficiente de correlação próximo a unidade. A concentração do analito, presente na amostra, é determinada pela medida da sua intensidade de emissão, cujo valor será correspondente ao da abscissa, dada pela curva analítica.

2.3 Oxidantes e Antioxidantes

Estudos epidemiológicos têm reafirmado a forte relação entre o consumo de vegetais ricos em compostos antioxidantes e a proteção contra várias doenças crônicas humanas, bem como suas atividades bioativas benéficas, tais como a ação anti-apoptótica e anticarcinogênica, inibindo os processos de proliferação celular (OMBRA *et al.*, 2016; PISOSCHI; NEGULESCU, 2011; BOUAYED; BOHN, 2010). A forte atividade bioativa em frutos está relacionada com quantidades substanciais de compostos antioxidantes, que os atribuem efeitos benéficos à saúde humana através da inibição ou neutralização de fontes oxidantes (WALTER; MARCHESAN, 2011; XU *et al.*, 2017; DZIAŁO *et al.*, 2016).

A produção de oxidantes em espécies aeróbicas vivas ocorre durante o processo de respiração pela redução do oxigênio molecular em etapas sequenciais para produzir água (KRUMOVA; COSA, 2016). Neste processo, espécies químicas intermediárias reativas de vida curta são produzidas como subprodutos, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como, posteriormente, são formadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs são agentes oxidantes altamente reativos e surgem da redução de um elétron do oxigênio molecular, com a formação das três espécies primárias: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (RAHMAN *et al.*, 2012), conforme apresenta a Figura 2.

Em condições fisiológicas normais, as EROs são importantes na produção de energia; defesa celular contra agentes estranhos, como vírus e bactérias; sinalização intercelular; e morte celular programada (apoptose) (SARMA *et al.*, 2010). Entretanto, as EROs são uma classe emergente, em que a exposição a poluentes, tais como tabaco, fumaça, drogas, xenobióticos, radiação e outros, contribui para sua produção excessiva, e, conseqüentemente, para o fenômeno do estresse oxidativo (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; SINGH; SINGH, 2008).

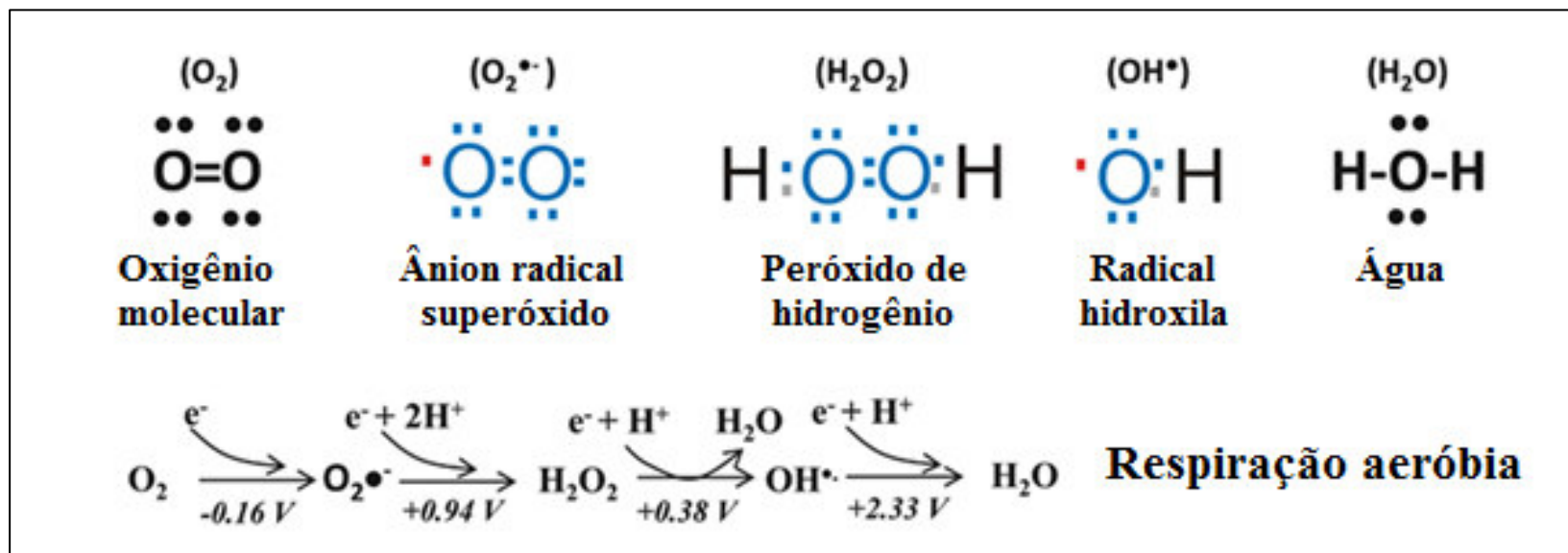


Figura 2 - Redução do oxigênio molecular à água durante a respiração aeróbica com a formação das EROs primárias, o potencial redox padrão para cada redução e as estruturas de Lewis (Adaptado de MAILLOUX, 2015).

O estresse oxidativo é definido pelo desequilíbrio causado pela excessiva produção de EROs e/ou limitada defesa antioxidante, o que implica em danos oxidativos a estruturas de biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares e, conseqüentemente, no desenvolvimento e progressão de diversas patologias incluindo as degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (KAUR; KAPOOR, 2002; MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000; WANG; CAO; PRIOR, 1996).

A fim de prevenir níveis patológicos de EROs, o organismo humano possui um sistema de defesa antioxidante formado por fontes antioxidantes endógenas e exógenas. Na condição de equilíbrio redox entre a produção de espécies oxidantes e a atuação da defesa antioxidante, figura a condição de homeostase em que há a regulação relativa do funcionamento fisiológico (Figura 3) (XU *et al.*, 2017; LÜ *et al.*, 2010).

Antioxidantes são compostos que, presentes em baixas concentrações quando comparados ao substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação destes, formando produtos inativos relativamente estáveis (LÜ *et al.*, 2010; FLORA, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2005). Um bom antioxidante possui: substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio à espécie reativa, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo; acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH *et al.*, 2004).

Antioxidantes endógenos podem ser compostos enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) ou não enzimáticos (ácido úrico, bilirrubina, albumina, metalotioneína) (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). No entanto, diante da produção excessiva de espécies oxidantes, antioxidantes endógenos não podem garantir um controle rigoroso e uma proteção completa do organismo. Este fato explica a necessidade de antioxidantes exógenos para manter o equilíbrio oxidativo (PISOSCHI; NEGULESCO, 2011).

Os antioxidantes exógenos têm origem de fontes vegetais naturais, tais como frutas, ervas, especiarias e chás, bem como são encontrados em suplementos nutricionais e produtos farmacêuticos. Estes compreendem compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, lignanas e estilbenos), carotenóides (xantofilas e carotenos), algumas vitaminas (vitamina E e C) e minerais (Se e Zn) (XU *et al.*, 2017).

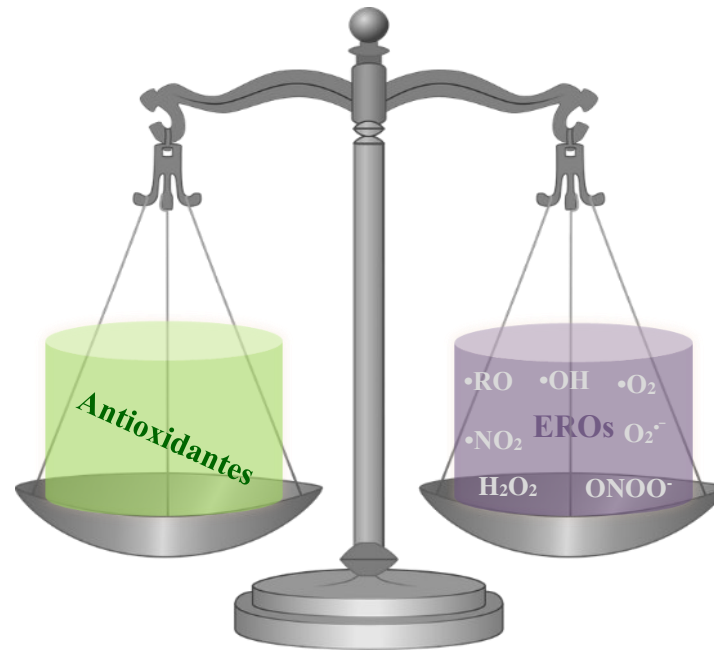
Principais fontes de Antioxidantes

Exógenas:

- Compostos fenólicos
- Carotenóides
- Vitaminas
- Minerais

Endógenas:

- Enzimáticos: superóxido dismutase, catalase e etc.
- Não enzimáticos: ácido úrico, bilirrubina e etc



Principais fontes de EROs

Exógenas:

- Drogas e xenobióticos
- Poluentes
- Radiação
- Tabagismo

Endógenas:

- Cadeia respiratória mitocondrial
- Enzimas intracelulares

Figura 3 - Equilíbrio entre compostos antioxidantes e as EROs (Adaptado de DAL; SIGRIST, 2016).

Devido à proteção contra fontes oxidantes, os compostos antioxidantes exógenos provenientes de fontes naturais têm recebido grande atenção e representam um potencial interessante para muitas aplicações, tais como a indústria de alimentos, cosméticos, nutracêutica, terapêutica e para a medicina. Desse modo, nos últimos anos, o interesse por métodos e variações que permitam determinar a capacidade antioxidante de vegetais aumentou consideravelmente (XU *et al.*, 2017; BALMUS *et al.*, 2016; WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2016; PRASAD, 2016; SALOMONE; GODOS; ZELBER-SAGI, 2016; ZHANG *et al.*, 2015; ARATHI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014; SINDHI *et al.*, 2013).

2.3.1 Determinação da capacidade antioxidante

Os diferentes métodos na literatura para a determinação da capacidade antioxidante de sistemas biológicos envolvem diferentes fontes oxidantes, e consequentemente, mais de um mecanismo químico (SHALABY; SHANAB, 2013). Além disso, a diversidade química dos antioxidantes permite que um comportamento diferente elimine a condição reativa de fontes oxidantes. Em vista disso, nenhum ensaio reflete com precisão o mecanismo de ação de todas as fontes radicais ou de todos os antioxidantes em um sistema complexo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), e, consequentemente, mais de um método de capacidade antioxidante deve ser usado para comparar o modo de ação de compostos antioxidantes puros ou brutos (MOHARRAM; YOUSSEF, 2014; SHALABY; SHANAB, 2013).

Metodologias analíticas tradicionais baseadas na espectrofotometria, eletroquímica e cromatografia têm sido utilizadas na determinação da capacidade antioxidante em vegetais, cada uma delas diferindo em relação ao mecanismo de geração de fontes oxidantes e/ou moléculas alvo, bem como à detecção/medição final dos produtos da reação. No entanto, nos últimos anos, tem sido feito um grande esforço no uso de métodos bioanalíticos mais sofisticados e precisos, como aqueles baseados em sensores eletroanalíticos e biossensores, a fim de melhorar o desempenho da detecção (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; PISOSCHI; NEGULESCO, 2011).

2.3.1.1 Métodos colorimétricos

Em geral, as técnicas espectrofotométricas são simples, rápidas e não dispendiosas, o que provavelmente explica seu uso difundido na triagem da capacidade antioxidante. Baseiam-se na reação de um radical, cátion radical ou complexo com uma molécula antioxidante capaz de transferir átomos de hidrogênio (HAT) e/ou transferir um elétron (SET) (MOHARRAM; YOUSSEF, 2014; PISOSCHI; NEGULESCO, 2011; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Neste estudo, foram empregados três métodos colorimétricos os quais foram adaptados a microplacas: DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS [2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)] e NBT (nitroazul de tetrazólio).

Os métodos DPPH e ABTS são baseados no mecanismo HAT e/ou SET a fim de neutralizar os radicais sintéticos DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente. Apesar de alguns autores afirmarem estes métodos como sendo baseados no mecanismo SET, sabe-se que os mecanismos HAT e SET ocorrem quase paralelamente em todos os sistemas, embora um mecanismo possa prevalecer em um dado ensaio, sendo o mecanismo dominante determinado pela estrutura e propriedades dos compostos antioxidantes, tais como acessibilidade química, solubilidade e coeficiente de partição, solvente empregado, entre outros (APAK *et al.*, 2013).

DPPH[•] e ABTS^{•+} são radicais orgânicos sintéticos com as cores púrpura e azul-esverdeado, respectivamente, que podem ser reduzidos na presença de antioxidantes (AOX), com a consequente descoloração, a qual é proporcional a capacidade antioxidante da amostra (Figura 4) (PISOSCHI; NEGULESCO, 2011; SINGH; SINGH, 2008; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método NBT por sua vez é baseado no mecanismo SET para eliminar os radicais ânions superóxidos (O₂^{•-}), os quais estão presentes em todos os sistemas biológicos aeróbicos e são considerados oxidantes citotóxicos quando em excesso. No método NBT, o substrato hipoxantina (HX) em presença da enzima xantina oxidase (XOD) gera radicais O₂^{•-}, que reduzem o reagente NBT (coloração amarela) ao produto colorido formazam (lilás), o qual pode ser medido espectrofotometricamente (Figura 5). No entanto, a presença da amostra antioxidante sequestra os radicais O₂^{•-} e produz um decréscimo na produção de formazam, e, conseqüentemente, na absorbância, proporcional a capacidade antioxidante da amostra (CORTINA-PUIG *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

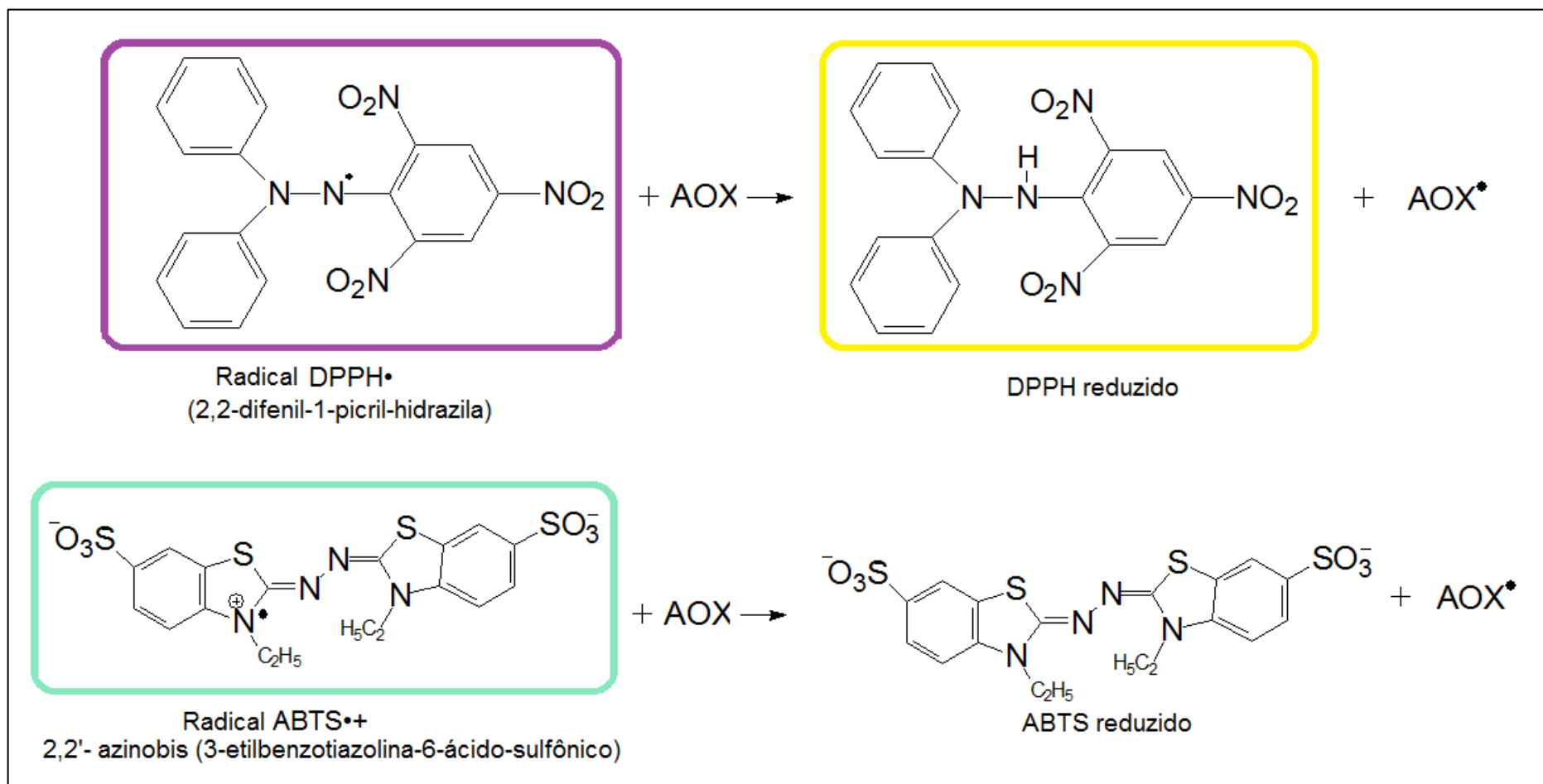


Figura 4 - Esquema de equações químicas envolvidas nos testes colorimétricos DPPH e ABTS (SINGH; SINGH, 2008; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

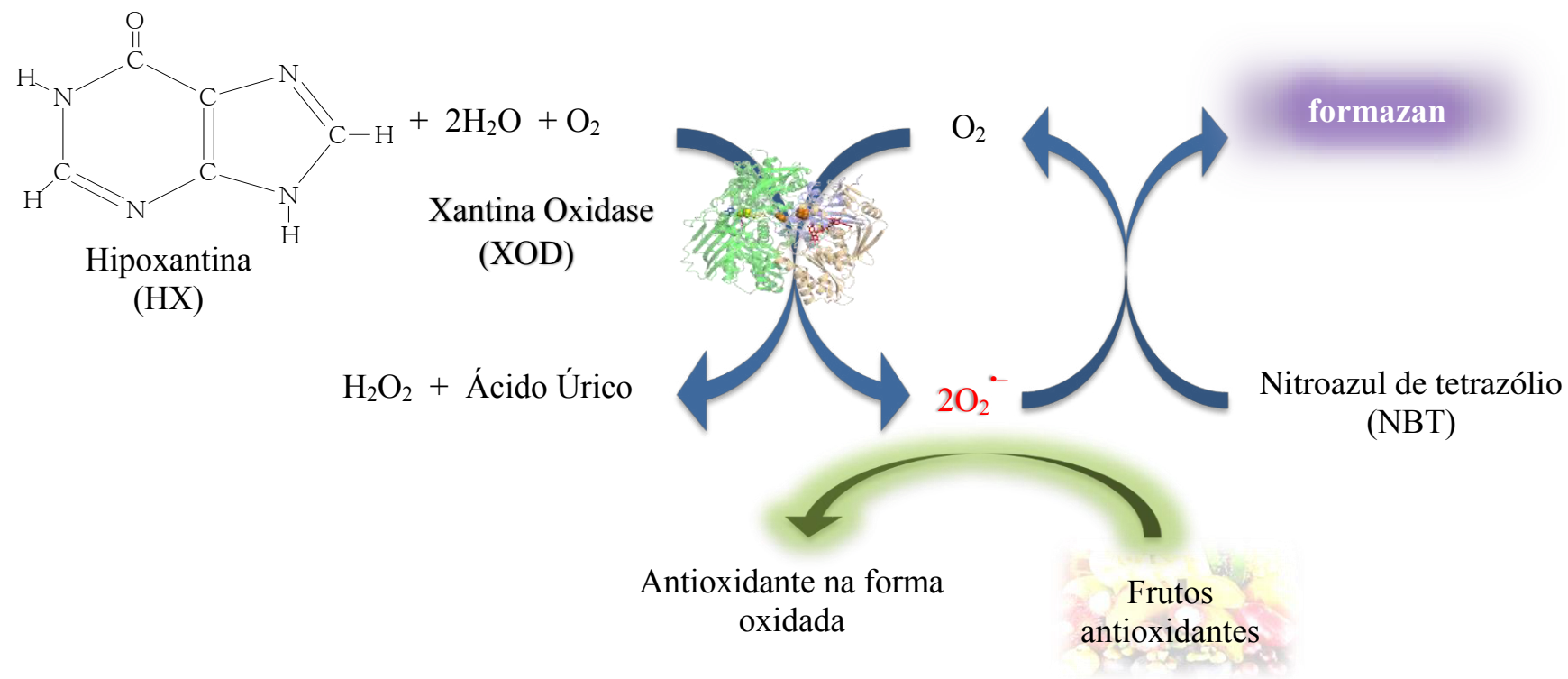


Figura 5 - Esquema de equação química envolvida na medida da capacidade de sequestro do radical superóxido pelo método NBT (BECKER *et al.*, 2019).

2.3.1.2 Biossensores amperométricos enzimáticos

Avanços na biotecnologia têm proporcionado a substituição ou suplementação de métodos tradicionais por outras tecnologias inovadoras, como os biossensores, que são ferramentas atrativas e promissoras na detecção de compostos antioxidantes e da capacidade antioxidante, devido à suas características analíticas, tais como especificidade, sensibilidade, baixo custo, miniaturização, fácil automação, economia de tempo e simplicidade de fabricação (DI FUSCO *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2004).

Por definição, um biossensor é um dispositivo analítico, ao qual se encontra acoplada uma entidade de reconhecimento biológica ou biologicamente derivada (enzimas, anticorpos, antígenos, organismo, tecido animal e vegetal, células, organelas e etc), associada a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal detectável proporcional à concentração do analito (ROSATTO *et al.*, 2001; FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992).

De um modo geral, em um biossensor o analito interage com o componente biológico (A) através de processos de biorreconhecimento que geram um sinal, o qual é convertido em sinal detectável pelo transdutor (B) que em seguida é filtrado, amplificado, analisado e transferido para um monitor ou dispositivo pela unidade processadora do sinal (C), conforme apresentado pela Figura 6. O sinal gerado é proporcional à concentração do analito na amostra (PATHAK; KATIYAR; GIRI, 2008; RAITERI; GRATTAOLA; BERGER, 2002).

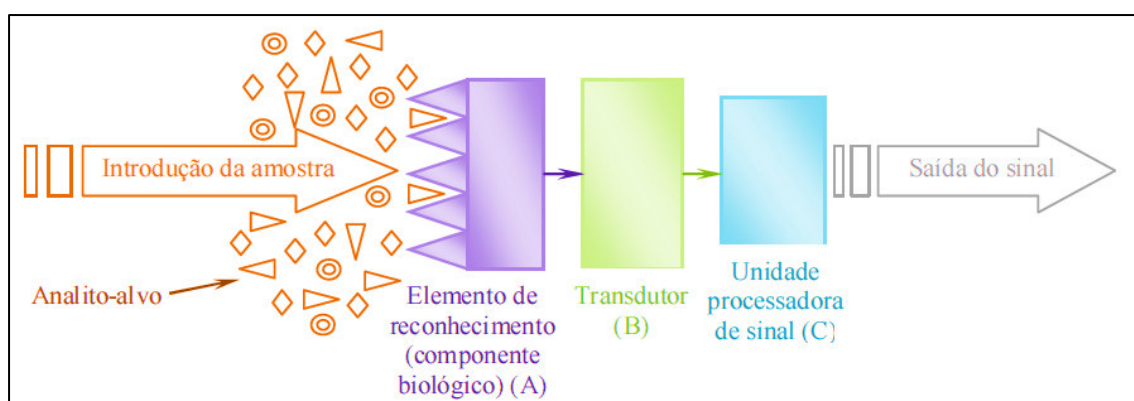


Figura 6 - Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais (CALIL; SILVA, 2011).

A Figura 7 mostra um esquema dos biossensores mais utilizados, em que para um mesmo analito de interesse pode-se desenvolver variados biossensores, imobilizando-se diferentes materiais biológicos, separadamente, em variados transdutores. Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico e o transdutor utilizado (SHAVANOVA *et al.*, 2016).

Devido à sua especificidade e propriedades catalíticas, as enzimas encontraram ampla aplicação na construção de biossensores, sendo a maioria dos biossensores construídos e comercializados para as mais variadas aplicações, enzimáticos e amperométricos (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

O desempenho de um biossensor é fortemente dependente da camada de detecção bioativa e da qualidade de sua associação ao transdutor. Por conta disso o processo de imobilização do componente biológico sobre o transdutor é uma das principais etapas na construção de um biossensor e deve garantir a biofuncionalização e estabilidade do elemento de reconhecimento biológico, proporcionando acessibilidade para o analito alvo e outras moléculas envolvidas no evento de biorechecimento, bem como um contato íntimo com a superfície do transdutor a fim de obter uma transferência de sinal eficiente (MARQUES; YAMANAKA, 2008; XU; PRIETO-SIMÓN; CAMPAS; MARTY, 2008; XU; CHEN; DONG, 2006).

Dentre os fatores que podem afetar a imobilização de biomoléculas, tem-se a natureza da biomolécula (tamanho, características estruturais, polaridade e acessibilidade de certos grupos funcionais), as condições de trabalho e armazenamento (pH do meio, salinidade, viscosidade e temperatura) e as propriedades físico-químicas e químicas do material do transdutor. Além disso, a escolha do suporte de imobilização deve estar intimamente relacionada com a estratégia de imobilização, com o princípio de detecção e deve favorecer a biocompatibilidade (PRIETO-SIMÓN; CAMPAS; MARTY, 2008).

De modo geral, as técnicas de imobilização enzimática influem na eficiência analítica do biossensor (sensibilidade, estabilidade, repetibilidade e tempo de resposta) e podem ser classificadas em físicas (adsorção e aprisionamento) e químicas (ligação covalente e ligação covalente cruzada) (GOUDA, 2000).

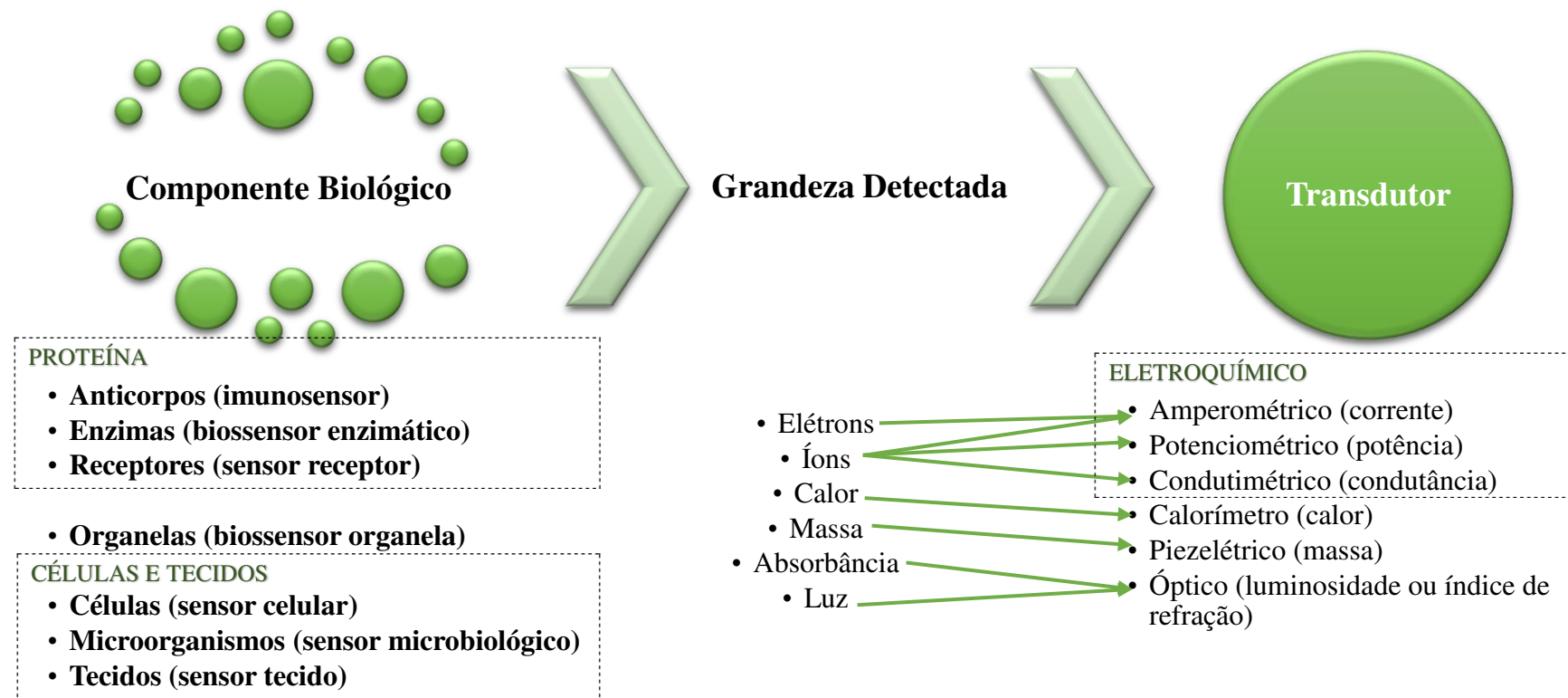


Figura 7 - Esquema de biossensores mais utilizados e suas classificações conforme o componente biológico e o transdutor utilizado (Adaptado de SHAVANOVA *et al.*, 2016).

A técnica de imobilização por aprisionamento foi empregada neste estudo e envolve a inclusão das enzimas em estruturas/membranas poliméricas (tais como álcoois poli vinílicos) com tamanho de poros que permitem a difusão dos substratos e produtos da reação de baixo peso molecular, mas que impedem a passagem/perda da proteína. Desse modo, a enzima é incorporada como parte da mistura a ser polimerizada, em que na medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura (SOUZA *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de biossensores amperométricos enzimáticos para a determinação da capacidade antioxidante em alimentos têm ocorrido como uma ferramenta analítica alternativa e eficiente frente aos métodos analíticos convencionais.

Lates *et al.* (2011) determinaram a capacidade antioxidante de bebidas comerciais na inibição das espécies reativas $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 geradas pelo sistema enzimático XA/XOD usando um biorreator acoplado a um biossensor amperométrico de H_2O_2 formado por um eletrodo de trabalho de grafite modificado com polímero gel de ósmio-polivinil piridina contendo peroxidase de rábano silvestre. O H_2O_2 resultante da reação enzimática foi monitorado amperometricamente a -100 mV vs Ag/AgCl/KCl_{sat}. Foram avaliados e otimizados diferentes procedimentos de imobilização da enzima XOD (adsorção física, ligação covalente e reticulação com glutaraldeído), concentrações do substrato XA e taxas de fluxo na injeção. Além disso, dois protocolos foram estudados para a determinação da capacidade antioxidante: estado estacionário (1), em que o antioxidante foi injetado no fluxo da XA; estado transiente (2) em que o substrato XA e antioxidante foram simultaneamente injetados. As condições otimizadas foram estabelecidas (imobilização por reticulação com glutaraldeído, XA a 0,5 mmol L⁻¹, taxa de fluxo de 1,5 mL min⁻¹) e a injeção em estado transiente garantiu um maior contato entre compostos antioxidantes e as EROs geradas, aumentando a probabilidade em inibir os radicais $O_2^{\cdot-}$ de curta meia-vida. O biossensor mostrou uma boa eficiência analítica com limite de detecção (LOD) de 2,2 mmol L⁻¹, limite de quantificação (LOQ) de 7,5 mmol L⁻¹, sensibilidade de 5 mA/mol L⁻¹ e faixa linear de até 50 mmol L⁻¹. Os resultados das amostras de sucos comerciais, quando empregado o biossensor desenvolvido, mostraram forte correlação com os resultados obtidos pelo método Folin. Várias vantagens foram demonstradas, tais como baixo potencial aplicado, fluxo simultâneo do antioxidante e XA, relevância biológica em virtude da determinação da capacidade antioxidante contra as espécies combinadas $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . No entanto o biossensor envolve

um sistema bienzimático encarecendo o processo, em que a enzima peroxidase de rábano, empregada na modificação do eletrodo de trabalho, apresenta limitações em ligações a superfícies sólidas, e, além do mais, empregou-se ósmio (oneroso e tóxico) para facilitar a transferência eletrônica no eletrodo de trabalho.

Campanella *et al.* (2003) avaliaram a capacidade antioxidante em inibir os radicais $O_2^{\bullet-}$ de frutos e chás aromáticos. Os radicais $O_2^{\bullet-}$ foram produzidos pelo sistema enzimático XA/XOD em solução, enquanto a enzima SOD foi imobilizada por aprisionamento em uma membrana de *kappa carragenina* para catalisar a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 . Assim, o H_2O_2 gerado foi oxidado na superfície do ânodo de platina (+650 mV *vs* Ag/AgCl), com a consequente geração de sinal amperométrico, proporcional a concentração de $O_2^{\bullet-}$ em solução. O biossensor se mostrou simples, com um mínimo de pré-tratamento necessário à amostra, com boa eficiência analítica apresentando um coeficiente de variação (CV) $\leq 10\%$, além de relação com métodos clássicos para determinação da capacidade antioxidante. Este mesmo grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento, otimização e aplicação deste biossensor para determinação da capacidade antioxidante em diversos tipos de amostras (CAMPANELLA *et al.*, 2013; CAMPANELLA *et al.*, 2009; CAMPANELLA *et al.*, 2004a; CAMPANELLA *et al.*, 2004b; CAMPANELLA *et al.*, 2003; CAMPANELLA; BONANNI; TOMASSETTI, 2003; CAMPANELLA *et al.*, 2001). Apesar do pequeno número de etapas necessárias e do bom desempenho analítico, o alto potencial aplicado pode admitir a oxidação direta dos compostos fenólicos (ROSATTO *et al.*, 2001) e sistemas bienzimáticos (imobilizados e/ou em solução) devem ser evitados por encarecer o custo do processo em virtude do valor dos reagentes e de grandes quantidades necessárias quando se emprega a enzima em solução. Além disso, o uso da enzima SOD para a geração de H_2O_2 poderia ser suprimido, uma vez que a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 ocorre de modo rápido e espontâneo, e que a medida da capacidade antioxidante, contra ambas as EROs, seria biologicamente mais interessante (CORTINA-PUIG *et al.*, 2010).

A capacidade antioxidante de amostras vegetais tem sido atribuída, especialmente, ao conteúdo em compostos fenólicos.

2.4 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são considerados um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários de plantas, devido a sua grande participação no desenvolvimento morfológico, processos fisiológicos e reprodução vegetal. São responsáveis pela cor, adstringência, aroma, estabilidade oxidativa, além de um amplo espectro de propriedades biológicas, conforme apresenta a Figura 8, que se devem à sua estrutura molecular variável (DZIAŁO *et al.*, 2016; ANGELO; JORGE, 2007).

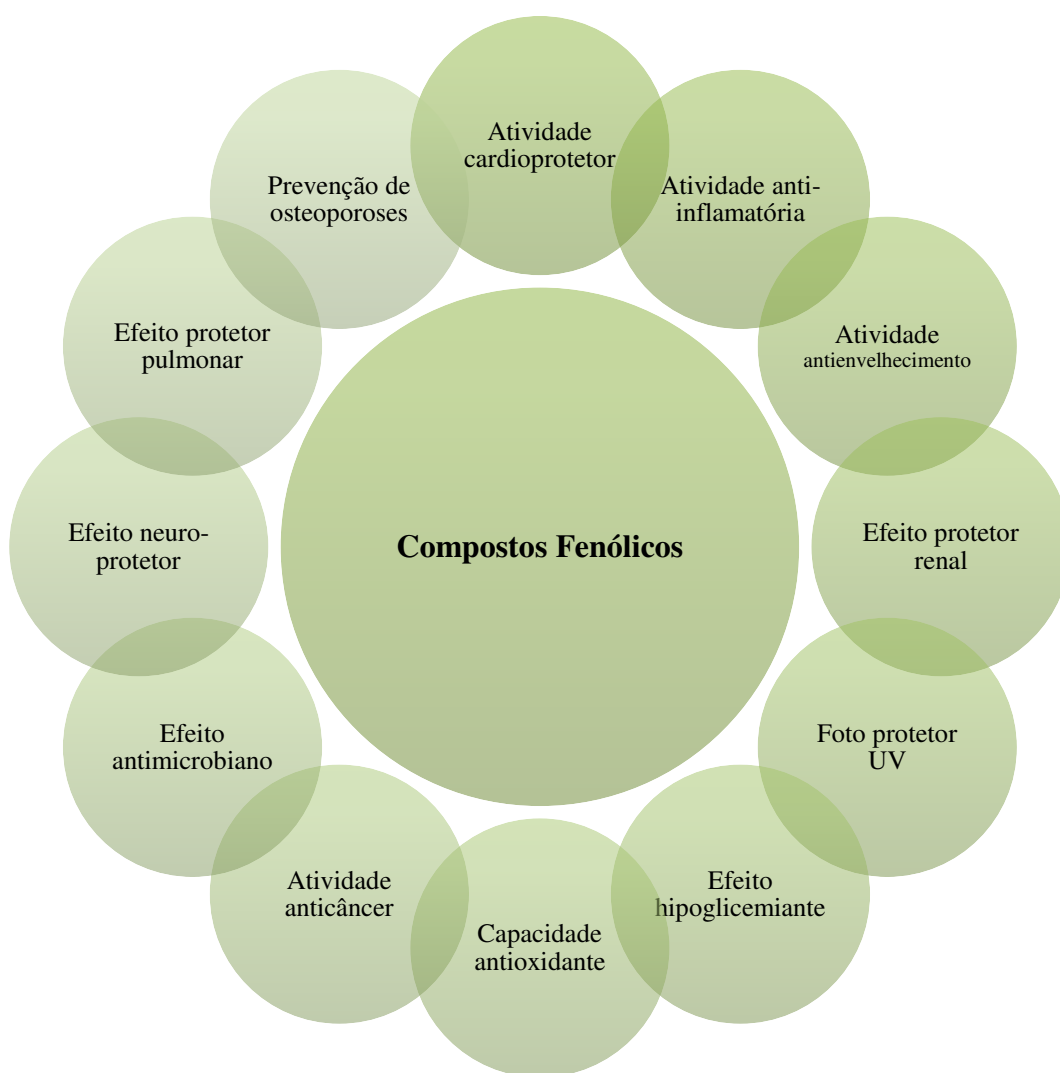


Figura 8 - Atividades biológicas conferidas aos compostos fenólicos naturais (Adaptado de LI *et al.*, 2014).

Compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem ao menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos

funcionais. Nas plantas, geralmente esses compostos contêm mais anéis fenólicos e, portanto, são chamados de polifenóis (ANGELO; JORGE, 2007; LEE *et al.*, 2005).

Compostos fenólicos podem ser classificados em compostos flavonóides e não-flavonóides, conforme apresenta a Figura 9.

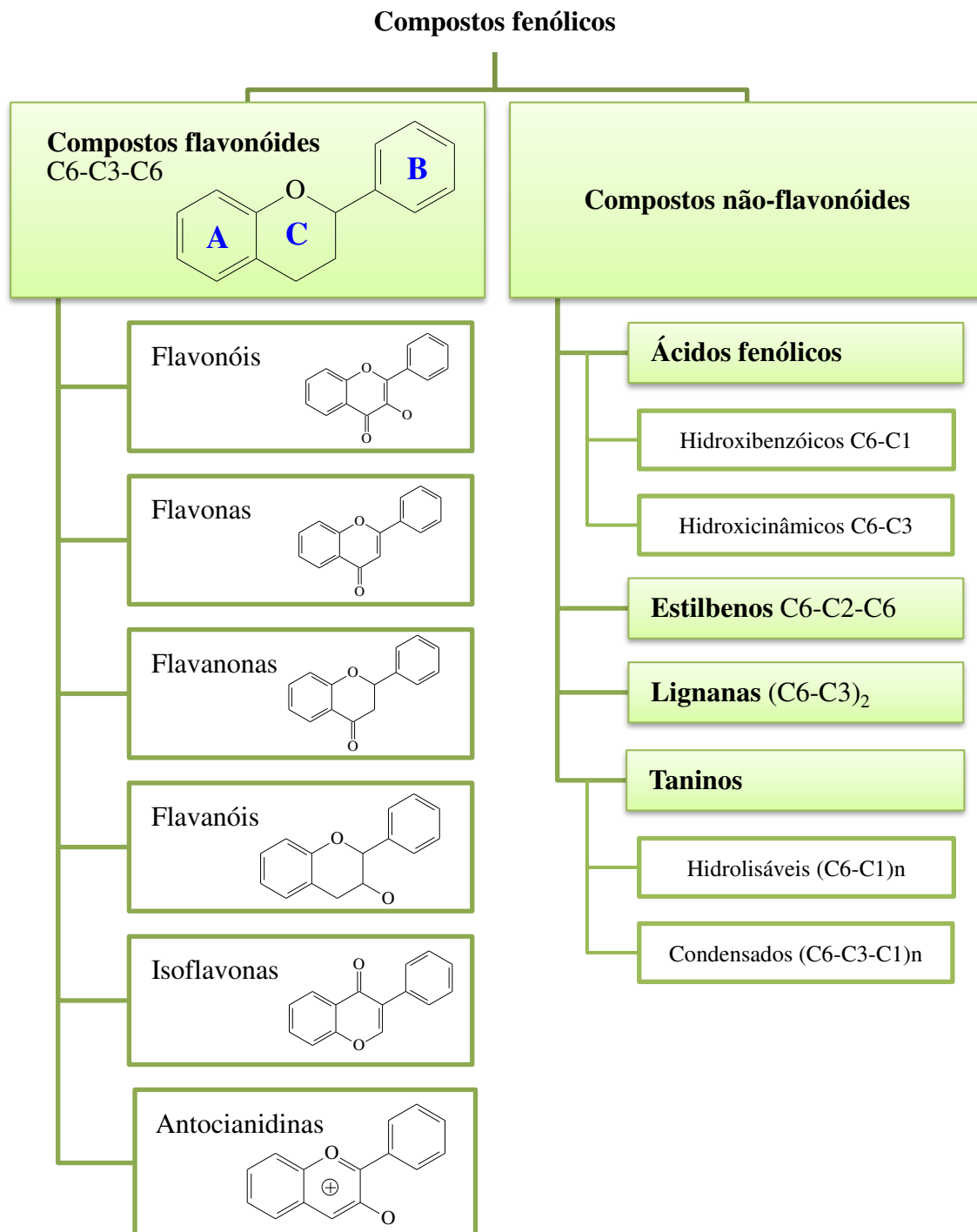


Figura 9 - Classificação dos compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007; HOLLMAN; KATAN, 1999).

Compostos flavonóides possuem baixo peso molecular e são caracterizados estruturalmente como difenil propanos (C6-C3-C6), com dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 9). Variações em substituições do anel C resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (ANGELO; JORGE, 2007; HOLLMAN; KATAN, 1999).

Em vegetais, os flavonóides compreendem o maior e mais diverso grupo de compostos fenólicos, em que desempenham funções de foto proteção, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante e inibição enzimática (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). *In vivo*, evidências confirmam atividades contra radicais livres, como antibióticos, antialérgicos, agentes antidiarreicos, anti-inflamatórios, entre outros (ARAGÃO, 2013; ROSS; KASUM, 2002).

Os principais compostos fenólicos não flavonóides consistem em ácidos fenólicos (hidroxibenzoatos e hidroxicinamas), estilbenos, lignanas e taninos.

Os ácidos fenólicos mais comuns em tecidos vegetais são os ácidos hidroxicinâmicos e incluem o ácido cafeico, clorogênico, cumárico, ferúlico e sinápicos. Taninos também são amplamente distribuídos nas plantas e podem ocorrer como taninos hidrolisáveis (formados na via dos ácidos fenólicos com polimerização do açúcar) e taninos condensados (combinação de flavonóides) (DZIAŁO *et al.*, 2016).

Sabe-se que grupos hidroxilas livres em compostos fenólicos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante destes, mas outros fatores também influenciam este comportamento, tal como o caráter dos substituintes (grupo carboxila ou acetila) e sua posição em relação aos grupos hidroxila (SROKA; CISOWSKI, 2003).

2.4.1 Determinação de compostos fenólicos

Vários métodos espectrofotométricos baseados em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos têm sido usados para estimar o conteúdo total de compostos fenólicos em extratos vegetais. Todavia, o que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu foi o empregado neste estudo e figura entre os mais extensamente empregados (SOUSA *et al.*, 2007).

O método baseia-se na capacidade do reagente Folin-Ciocalteu (coloração amarela) ser reduzido ao complexo fosfo-túncio/fosfomolibdênio (cromóforo azul) por substâncias redutoras como os compostos fenólicos. Conforme a reação apresentada na Figura 10, os compostos fenólicos (representado pelo ácido gálico), em meio alcalino, dissociam um próton, levando à formação do ânion fenolato que reduz o reagente de Folin-Ciocalteu. Assim, a concentração do cromóforo formado (coloração azul) é proporcional a concentração de substâncias redutoras ou compostos fenólicos presentes na amostra e pode ser estimada espectrofotometricamente na região do visível (PIRES *et al.*, 2017).

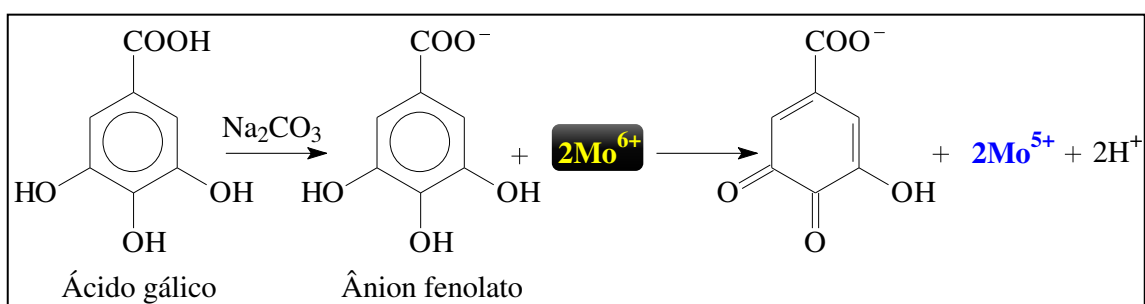


Figura 10 - Esquema de equação proposta para o método Folin-Ciocalteu (PIRES *et al.*, 2017).

A determinação de substâncias fenólicas em alimentos é ainda mais complexa, não só por causa da natureza da matriz, mas também pela diversidade dos compostos existentes, com grande variabilidade de estruturas químicas. Além disso, as substâncias fenólicas possuem uma diversa faixa de polaridade e tamanho, e podem ser encontradas em diferentes níveis de concentração. Assim, a separação, determinação e identificação, bem como a sua extração das amostras, não é um processo fácil. Essa análise tem sido feita principalmente mediante métodos baseados na técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas ou espectrometria de massas tandem (BARBOSA *et al.*, 2018; LUCCHI; SAURINA; NÚÑEZ, 2017).

A CLAE é o tipo mais versátil e mais amplamente empregada de cromatografia por eluição que permite separar, identificar e determinar componentes de uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. A Figura A3 do Anexo A, apresenta os componentes típicos de um sistema CLAE convencional, bem como uma ligeira explanação sobre o funcionamento dos seus componentes.

Nos últimos anos, diferentes fabricantes adaptaram equipamentos que permitiram a miniaturização da técnica, denominando-a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE). A CLUE proporciona a máxima eficiência cromatográfica das partículas porosas inferiores a 2µm e, com isso, ganha em resolução, sensibilidade, tempo de retenção, velocidade linear, largura e eficiência nos sinais, permitindo assim uma análise mais rápida e com um gasto de solventes e amostra menores entre as análises quando comparadas com a CLAE (partículas convencionas de 10 µm, 5 µm ou 3,5 µm) (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento das propriedades nutricionais, antioxidantes e bioativas de frutos nativos da região amazônica e desenvolver uma ferramenta de eficiência analítica para determinação da capacidade antioxidante em amostras reais.

3.2 Objetivos Específicos

No tocante aos frutos abiu (*Pouteria caimito*), açai (*Euterpe oleracea*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Rollinia orthopetala*), buriti (*Mauritia flexuosa*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), inajá (*Maximiliana maripa*), monguba (*Pachira aquatica*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e uxi (*Saccoglottis uchi*):

- Caracterizar bromatologicamente em relação aos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas totais, carboidratos totais, energia, pH e acidez em ácido cítrico;
- Determinar os elementos minerais Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na e Zn por ICP OES e avaliar os resultados, considerando a complexidade de cada matriz, a otimização instrumental, a essencialidade e/ou toxicidade dos elementos nos limites de tolerância fisiológica;
- Determinar a capacidade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos (1:1) pelos métodos DPPH, ABTS e NBT;
- Avaliar a atividade antiproliferativa de extratos dos frutos contra linhas celulares de câncer de cólon humano (caco-2) pelo método sulforodamina B (SRB);

- Determinar compostos bioativos através da quantificação da vitamina C e compostos fenólicos por titulometria de óxido-redução e colorimetria, respectivamente;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos, por CLUE acoplado a espectrometria de massas de alta resolução, dos frutos com maiores capacidades antioxidantes e atividade antiproliferativa.

No que concerne à nova ferramenta analítica para determinação da capacidade antioxidante (biossensor):

- Desenvolver um biossensor amperométrico para determinação da capacidade antioxidante em amostras reais;
- Otimizar o processo de biofuncionalização do biossensor;
- Caracterizar a eficiência analítica do biossensor desenvolvido por meio de figuras de mérito;
- Aplicar o biossensor para determinação da capacidade antioxidante de antioxidante puro e amostras reais de frutos amazônicos e não autóctones.

4. JUSTIFICATIVA

Por prevenir e até mesmo curar algumas enfermidades e/ou restabelecer a saúde, o consumo de alimentos naturais tem sido incentivado. O mecanismo de ação dos nutrientes presentes nestes alimentos, tais como minerais, vitaminas e compostos bioativos, sustentam essa valorização (SANTOS; LIMA, 2008).

A alimentação carente em minerais e vitaminas tem vitimado bilhões de pessoas a sobreviverem em condições abaixo de seus potenciais físico e mental. Dentre os fatores que contribuem na manutenção deste quadro pluricarencial destacam-se a falta de recursos econômicos e o hábito de valorização de alimentos industrializados ou alimentos importados de outras regiões. Certamente o desconhecimento do valor nutricional de alimentos regionais favoreceram enormemente esses fatores (MANDELBAUM-SCHIMID, 2004).

Com uma gigantesca diversidade em espécies vegetais, a região amazônica apresenta milhares de espécies nativas não estudadas (HIGUCHI; HIGUCHI, 2004), em que a dimensão geográfica aliada a grande biodiversidade vegetal possivelmente explica a existência de espécies com potencial alimentício e farmacológico desconhecido (KINUPP; BARROS, 2008).

Dentre os alimentos naturais, os frutos se destacam por serem sabidamente fontes em minerais, vitaminas e compostos antioxidantes (SINDHI *et al.*, 2013; ALISSA; FERNS, 2012; TACO, 2011; RUFINO *et al.*, 2010; HAMID *et al.*, 2010; FRANCO, 2005; STEINMETZ, POTTER, 1996). Apesar da diversidade em frutos nativos amazônicos e do forte apelo em novas cores, sabores e texturas, e ainda da relevância econômica, nutricional e terapêutica de frutos, e do fato do conteúdo nutricional de frutos silvestres serem, em geral, superiores aos de frutos domesticados (ODHAV *et al.*, 2007), ainda assim são escassas as informações sobre a composição bromatológica, mineral e de compostos bioativos de frutos nativos da região amazônica o que favorece sua desvalorização local e nas demais regiões brasileiras (BORGES *et al.*, 2013).

Diante disso, a caracterização de frutos nativos da região amazônica é importante, não só por se referir a novos dados dos constituintes considerados importantes à saúde humana, mas também por estar relacionado à saúde e produtividade do vegetal. Dados sobre a composição de frutos nativos são essenciais para agregar valor e encorajar o mercado nacional e internacional e assistir a indústria de alimentos, de cosméticos, farmacêutica, dentre outras. Além disso, o conhecimento da composição química é essencial para o controle de qualidade e segurança alimentar, bem como para a avaliação da adequação da ingestão de nutrientes por indivíduos ou populações (TACO, 2011).

Com o atual aumento no interesse pela determinação da eficácia e uso de antioxidantes naturais em diversas aplicações como na tecnologia de alimentos, indústria de cosméticos, nutracêutica, medicina e outros, o desenvolvimento de métodos para a determinação da capacidade antioxidante contra radicais de relevância biológica tem recebido muita atenção. Em geral, métodos espectrofotométricos, eletroquímicos e cromatográficos têm sido explorados para este fim (PISOSCHI; NEGULESCO, 2011).

Os métodos convencionais apresentam desvantagens que podem estar relacionadas ao emprego de radicais sintéticos que não refletem as espécies reativas que existem naturalmente em sistemas biológicos; instabilidade das fontes oxidantes empregadas; solubilidade e pH limitados a fonte oxidante; morosidade em virtude do número de etapas; equipamentos caros que exigem operador treinado; impossibilidade de uso *in loco*; baixo desempenho analítico; entre outros (SINDHI *et al.*, 2013; SINGH; SINGH, 2008; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Nas duas últimas décadas biossensores eletroanalíticos têm sido considerados uma alternativa eficiente para medir a capacidade antioxidante em alimentos, apresentando um

desempenho superior aos ensaios convencionais (LATES; MARTY; POPESCU, 2011). Entre eles os biossensores amperométricos baseados na capacidade de eliminar os radicais $O_2^{\cdot-}$ e/ou H_2O_2 gerados em sistema *in vitro*, são os mais aplicados em matrizes vegetais. No entanto, uma série de desvantagens foram observadas, como altos potenciais de trabalho que permitem interferências eletroquímicas, alta quantidade de enzimas ou ainda sistema bienzimáticos que encarecem o processo total, ausência de aplicações em amostras reais de alimentos e uso de metais pesados tóxicos como mediadores eletroquímicos (CORTINA-PUIG *et al.* 2010; CAMPANELLA *et al.*, 2013; LATES; MARTY; POPESCU, 2011; CORTINA-PUIG *et al.* 2009; CAMPANELLA *et al.*, 2009; CAMPANELLA *et al.*, 2004a; CAMPANELLA *et al.*, 2004b; CAMPANELLA *et al.*, 2003; CAMPANELLA; BONANNI; TOMASSETTI, 2003; CAMPANELLA *et al.*, 2001).

Uma ferramenta analítica que apresente vantagens frente as limitações dos métodos convencionais e seja passível de utilização diretamente no ambiente (*in situ*) minimizaria perdas de compostos antioxidantes sensíveis a condições de luminosidade, temperatura e presença de oxigênio, tais como a vitamina C, taninos e antocianinas. Além disso, uma vez retirada das diversas influências físicas (pressão, temperatura, luz, clima, intemperismo e etc), químicas (acidez, alcalinidade, hidratação, fotodecomposição e etc) e biológicas (fisiologia animal ou vegetal, ambiente de produção e etc) do seu meio, a amostra em geral sofre alteração no seu equilíbrio natural (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004).

Neste sentido, é evidente a necessidade de uma ferramenta analítica para determinação da capacidade antioxidante que busque solucionar os problemas apresentados pelas técnicas existentes e que ofereça as vantagens de construção facilitada, alta precisão, sensibilidade de detecção e possibilidade de utilização tanto em laboratório quanto *in loco*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório do Grupo de Estudos e Análises Ambientais - GEEA da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em laboratórios da Universidade Federal de Roraima (UFRR) e no Laboratório *Biosensors-Analyses-Environment* (BAE) da Universidade de Perpignan Via Domitia (UPVD).

5.1 Reagentes e Demais Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica e a água utilizada foi deionizada (Milli-Q Millipore $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Azul da Prússia ou ferrocianeto férrico (PB) foi obtido da Gwent Group (Torfaen, United Kingdom). Fotopolímero álcool polivinílico hidrossolúvel (PVA-AWP) foi adquirido da Toyo Kogyo Corporation (Chiba, Japan). Éter de petróleo, hidróxido de sódio (NaOH), biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$), fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), iodeto de potássio (KI), amido anidro, iodato de potássio (KIO_3), ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido de ítrio (Y_2O_3), quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), Folin-Ciocalteu (FC), carbonato de sódio (Na_2CO_3), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS), persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nitroazul de tetrazólio (NBT), hipoxantina (HX), enzima xantina oxidase do leite bovino (XOD) e etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Soro Bovino Fetal (SBF), solução de aminoácidos não essenciais (ANE), penicilina ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), estreptomicina ($\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12}$), anfotericina ($\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NO}_{17}$), ácido tricloroacético (ATA), sulforodamina B (SRB), ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation (Nasdaq-Sial, Darmstadt, Germany). Metanol (CH_3OH), acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), ácido fórmico (CH_2O_2) e acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) também foram obtidos da Sigma-Aldrich, e ácido clorídrico (HCl) foi da Merck (Seelze, Alemanha).

As soluções padrões de compostos fenólicos foram preparadas a partir de diluições de 53 padrões de 1000 mg L^{-1} de grau de pureza exigida pela técnica em

metanol, em frascos de vidro âmbar. Todos os compostos fenólicos estudados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Os materiais utilizados como vidros e plásticos empregados nas determinações elementares foram previamente deixados em um banho de HNO₃ a 10% (v/v) por no mínimo 24 h, lavados com água e secos. As soluções de Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na e Zn foram preparadas a partir da diluição de padrões de pureza analítica a 1000 mg L⁻¹ (Merck Millipore Certipur®; Specsol®) em 2% (v/v) de HNO₃.

Todo material volumétrico de precisão foi previamente calibrado.

5.2 Equipamentos

As desidratações por criodessecação foram realizadas em um liofilizador (Liotop, L101) por 48 h até completa desidratação, operando com pressão de 30 10⁻³ mmHg e temperatura de -50°C. A Figura B1 do Anexo B mostra as fotos do equipamento.

As extrações para as determinações elementares foram realizadas em forno micro-ondas (CEM Corporation, MARS Xpress 6.0, Matthews, NC, USA). Para extração dos minerais, as amostras foram inseridas em tubos de teflon que acompanham o equipamento. A Figura B2 do Anexo B mostra as fotos do equipamento, com destaque para o carrossel onde se encontram os tubos de teflon.

Para as análises elementares, foi empregado um sistema de Espectrometria de Emissão Óptica Com Plasma Indutivamente Acoplado, ICP OES (Shimadzu, ICPE-9820, Japan) sob 1,2 kW de potência e 10 L min⁻¹ de fluxo de argônio. A Figura B3 do Anexo B apresenta fotos do sistemas de ICP OES.

Para extração de compostos antioxidantes, foi empregado um misturador de amostras (Invitrogen, HulaMixer, Carlsbad, USA). Centrifugações de extratos foram realizadas em uma centrífuga de 12 furos (Hettich, Rotina 380 R, Tuttlingen, Germany). Determinações espectrofotométricas foram realizadas em leitor de ELISA (Multiskan Ex Primary, Shanghai, China) utilizando o *software* Ascent, versão 2.6. As leituras de absorbância, durante os testes de viabilidade celular, foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura múltipla (Biotex Sinergy ht Siafrtd, Vermont, EUA).

As determinações cromatográficas dos compostos fenólicos foram realizadas empregando-se um sistema CLUE Accela (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) (Figura B4, Anexo B), equipado com uma bomba quaternária, um autoamostrador e uma

coluna de fase reversa Ascentis Express C₁₈ de camada porosa (150 × 2,1 mm, tamanho de partícula parcialmente porosa de 2,7 µm) fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA, EUA). O sistema CLUE foi acoplado a um sistema de espectrometria de massa de alta resolução Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização aquecida (HESI-II) operada em modo de ionização negativa. Os dados brutos da espectrometria de massas foram processados pelo *software* ExactFinder versão 2.0 (Thermo Fisher Scientific) através da aplicação de uma lista de bancos de dados, compreendendo os 53 compostos fenólicos estudados e caracterizados.

As medições amperométricas foram realizadas empregando-se um potenciostato MicroAutolab III Type (Metrohm, Netherlands), com auxílio do *software* General Purpose Electrochemical System (GPES), versão 4.9. A Figura B5 do Anexo B apresenta fotos do potenciostato, dando destaque ao conector feito sob encomenda para adaptação do biossensor. As medidas foram realizadas em célula de vidro escuro de 10 mL preenchida com solução tampão K-PBS de 50 mmol L⁻¹ contendo KCl a 10 mmol L⁻¹ (pH 7,5) sob agitação magnética (300 rpm), à temperatura ambiente.

5.3 Caracterização de Frutos da Região Amazônica

5.3.1 Amostras e amostragem

Dez frutos nativos da região amazônica foram contemplados neste estudo e os dados sobre a porção avaliada e locais de coleta são apresentados na Tabela 1.

A seleção dos frutos bacuri, biribá, inajá, monguba, pajurá e uxi se deu em virtude da escassez de informações sobre suas propriedades químicas e biológicas nas tabelas de alimentos brasileiras (FRANCO, 2005; TACO, 2011; BRASIL, 2015), bem como pela desvalorização destes frutos no mercado nacional sem que ao menos se conheçam suas potencialidades (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2015). Por outro lado, os frutos de abiu, açaí, buriti e cupuaçu foram também estudados devido existirem informações na literatura úteis para fins de comparação com os resultados obtidos nesta pesquisa.

As amostras foram devidamente acondicionadas em sacos plásticos, rotuladas, armazenadas em caixas térmicas refrigeradas e transportadas imediatamente ao laboratório. No laboratório as amostras foram lavadas em água corrente abundante com

a finalidade de remover partículas do solo, poeiras e outros resíduos. Em seguida, foram mergulhadas em água deionizada por três vezes, secas a temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C (freezer) até o momento da análises. As amostras, em base úmida, foram empregadas nas análises bromatológicas, minerais e na determinação da concentração de vitamina C. Enquanto uma parte das amostras foi liofilizada e armazenada em embalagens a vácuo e ao abrigo de luz para as demais análises (vide Figura B8, Anexo B).

Tabela 1 - Informações agrônômicas, de classificação e de localização da amostragem dos frutos amazônicos estudados

Nome comum	Nome científico	Família	Porção estudada	Localização Geográfica
Abiu	<i>Pouteria caimito</i>	Sapotaceae	Polpa	02°49'12,4"N 60°42'03,4"W
Açaí	<i>Euterpe oleracea</i>	Arecaceae	Polpa Tipo B	02°47'10,6"N 60°45'05,8"W
Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	Clusiaceae	Polpa	02°31'46,1"S 44°18'21,9"W
Biribá	<i>Rollinia orthopetala</i>	Annonaceae	Polpa	02°53'54,0"N 61°01'01,9"W
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	Arecaceae	Polpa	03°22'17,7"N 59°51'45,0"W
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i>	Sterculiaceae	Polpa	02°50'43,3"N 60°39'40,8"W
Inajá	<i>Maximiliana maripa</i>	Arecaceae	Polpa	02°46'34,7"N 60°42'17,1"W
Monguba	<i>Pachira aquática</i>	Malvaceae	Amêndoas	02°53'54,9"N 61°00'59,1"W
Pajurá	<i>Couepia bracteosa</i>	Chrysobalanaceae	Polpa	02°40'20,1"S 56°46'13,7"W
Uxi	<i>Saccoglottis uxi</i>	Humiriaceae	Polpa	02°36'59,9"S 56°39'28,8"W

Exsicatas das amostras foram produzidas e incorporadas ao Herbário do Museu Integrado de Roraima (MIRR) para dirimir eventuais dúvidas acerca da identificação taxonômica do material sob estudo.

5.3.2 Caracterização bromatológica

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios, bem como o valor do pH e a acidez em ácido cítrico foram determinados em triplicata, de acordo com as metodologias oficiais (Quadro 2) adotadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e *Association Of Official Analytical Chemists-AOAC* (CUNNIFF, 1998).

Quadro 2 - Descrição resumida dos métodos bromatológicos empregados

Parâmetro	Método	Código do Método
Umidade	Secagem direta em estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$	012/IV
Acidez em Ác. Cítrico	Titulometria com NaOH	016/IV
pH	Medida direta em pHmêtro	017/IV
Cinzas	Aquecimento em mufla a $550 \pm 10^{\circ}\text{C}$	018/IV
Lipídeos	Extração direta em soxhlet com extrator éter de petróleo	032/IV
Proteínas	Kjedhal clássico	036/IV

FONTE: IAL, 2008.

O teor de carboidratos, em porcentagem, foi calculado pela diferença percentual, considerando-se a somatória dos valores de proteínas, lipídeos, umidade e cinzas (AOAC, 1997). O valor da energia total, em Kcal por 100 g de amostra, foi estimado considerando o calor de combustão e a digestibilidade a partir dos teores de proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando o coeficiente de conversão de 9 Kcal g^{-1} de lipídeos e 4 Kcal g^{-1} de proteínas e carboidratos (MERRILL; WATT, 1973).

5.3.3 Determinação dos teores de minerais

Foi empregado o procedimento convencional (AOAC, 2002) para a extração dos minerais das matrizes vegetais, em forno micro-ondas, seguido da análise dos elementos empregando-se a técnica ICP OES. Massas exatas de 1,0 a 2,0 g das amostras homogeneizadas (massa úmida) foram tomadas diretamente em um tubo de digestão, de modo a não ultrapassar 0,5 g da amostra em massa seca. Ao tubo, foram adicionados, sequencialmente, 5,0 mL de HNO_3 concentrado, 2,0 mL de H_2O_2 a 30% (v/v) e 0,5 mL

de Y_2O_3 a 100 mg L^{-1} , este último usado como padrão interno. A mistura foi submetida a um programa de aquecimento em forno de micro-ondas, cujas condições de operação são apresentadas na Tabela 2 (AOAC, 2002).

A solução resultante foi diluída para 25,0 mL e filtrada em papel filtro quantitativo ($28 \mu\text{m}$), devido à presença de partículas em suspensão. Brancos foram preparados para cada uma das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 2 - Programa de digestão em forno micro-ondas

Etapas	Potência (W)	Duração (min)
1	250	3
2	630	5
3	500	22
4	0	15

A determinação dos elementos Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Na e Zn foi realizada pela técnica de ICP OES, cujas condições gerais de operação utilizadas e suas especificações são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições experimentais de operação do ICP OES

Parâmetros	Dados
Espectrômetro	Shimadzu, Modelo 9820
Software	ICPEsolution Launcher
Nebulizador	Concêntrico
Gerador de radiofrequência	1,2 Kw
Vazão do Argônio	Auxiliar: $0,6 \text{ L min}^{-1}$ Principal: 10 L min^{-1}
Fluxo do gás de arraste	$0,7 \text{ L min}^{-1}$
Velocidade de rotação da bomba peristáltica	20-60 rpm
Correção de fundo	2 pontos
Configuração da visão	Radial: Mg e Na Axial: Ca, Cu, Fe, Li, Mn e Zn
Linhas de Emissão Atômica ($\lambda \text{ nm}$)	Ca (183,801); Cu (327,396); Fe (259,940); Li (610,364); Mg (383,826); Mn (257,610); Na (589,592); Zn (213,856).

A otimização instrumental para a determinação de cada espécie mineral estudada foi feita mediante sensibilidade, linearidade e comprimento de onda. As curvas analíticas foram definidas para sete pontos. Neste estudo, foram adotados os seguintes parâmetros, de forma a caracterizar a eficiência analítica: a precisão através do CV, LOD, LOQ e exatidão.

O LOD representa a concentração ou massa mínima do analito que pode ser detectada, em um nível de confiança conhecido (TALEUZZAMAN, 2018), o qual foi obtido por meio da razão entre a média de dez (10) determinações do desvio padrão do sinal do branco dos padrões (*Sbr*) e a inclinação da curva analítica (*m*), multiplicado pelo fator 3 (três), conforme expressão (1):

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot Sbr}{m} \quad (1)$$

O LOQ representa a menor concentração em que determinações quantitativas podem ser realizadas, o qual foi calculado por meio de dez vezes a razão entre a média de dez (10) determinações do desvio padrão do sinal do branco das amostras (*sbr*) e a inclinação da curva analítica (*m*), conforme a expressão (2):

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot sbr}{m} \quad (2)$$

A exatidão do método indica a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013). Na ausência de material de referência certificado para as matrizes nos analitos estudados, a avaliação da exatidão foi feita através de experimentos de adição de padrão e cálculo dos índices de recuperação para três amostras (biribá, buriti e uxi), em dois níveis de concentração, com três replicatas cada, seguindo o mesmo procedimento dado às amostras. Os níveis de concentração adicionados foram estabelecidos através de compilações da literatura, considerando a concentração na amostra e o LOQ obtido para cada espécie metálica. Assim, foram adotados os seguintes níveis mínimo e máximo, respectivamente, para os ensaios de fortificação: 8,0 e 16,0 mg L⁻¹ para os macrominerais Ca, Mg e Na; 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ para Li; 0,2 e 0,4 mg L⁻¹ para os microminerais Cu, Fe e Zn; 0,12 e 0,24 mg L⁻¹ para Mn.

5.3.4 Determinação da capacidade antioxidante

Para determinar a capacidade antioxidante das amostras, o método de extração foi previamente definido. Para isso, o ensaio de DPPH foi selecionado e aplicado nas amostras de buriti e uxi. Nessa etapa, foi estudada a influência das variáveis tempo, temperatura, concentração inicial das amostras e tipo de recuperação dos sobrenadantes. Desta forma, foram testados quatro tempos (*overnight*, 3 h, 1 h e 5 min), dois valores de temperatura (4°C e T_{amb}), dois valores de concentração inicial das amostras (25 e 100 mg mL⁻¹), e três procedimentos de recuperação dos sobrenadantes [centrifugação, filtração com filtro de membrana de celulose de 0,45 µm e filtração com filtro de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 µm]. A extração procedeu-se por agitação em misturador, seguida de extração assistida por ultrassom (Figura 11).

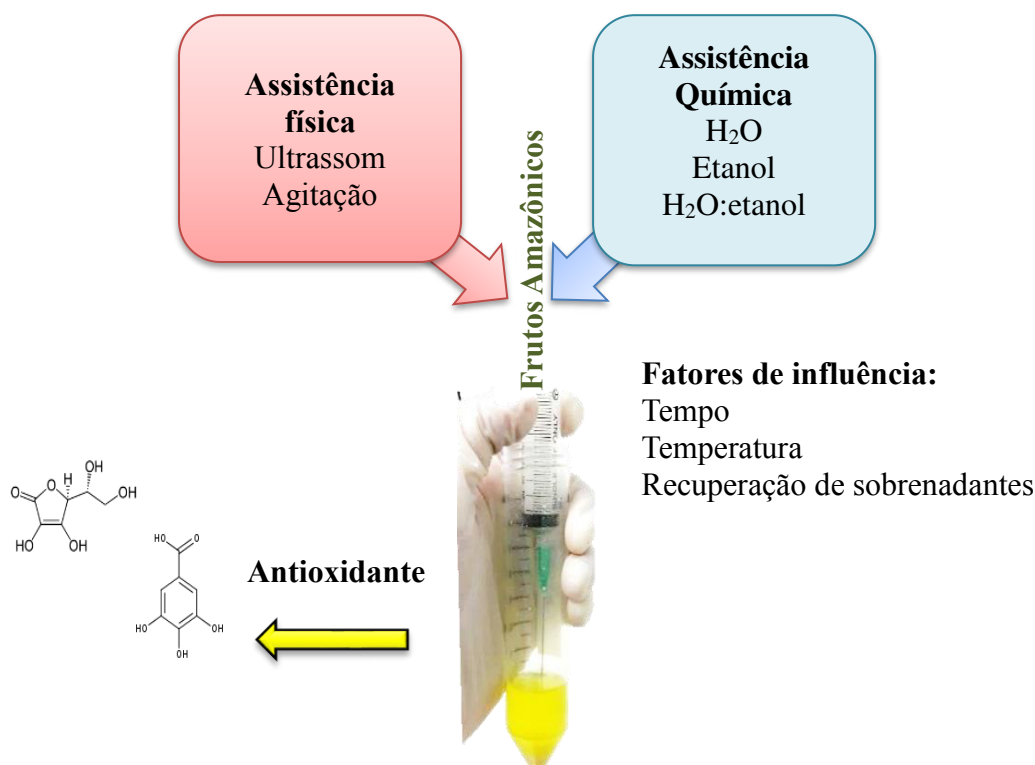


Figura 11 - Esquema do método de extração dos compostos antioxidantes, previamente à determinação do potencial antioxidante dos frutos.

Os melhores resultados de inibição foram obtidos mediante extração utilizando 100 mg mL⁻¹ das amostras liofilizadas, seguida de agitação a 4°C, protegidas da luz,

durante 1 h no misturador de amostras. O sobrenadante foi coletado após centrifugação por 10 min a 5000 rpm.

Extratos das amostras liofilizadas, em concentrações decrescentes, foram preparados por diluição e submetidos aos ensaios miniaturizados de DPPH, ABTS e NBT e os resultados expressos como a concentração da amostra (mg mL^{-1}) capaz de inibir 50% das fontes oxidantes (IC_{50}) em equivalentes de ácido ascórbico (antioxidante padrão). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em um leitor de microplacas.

5.3.4.1 Método DPPH

O efeito do extrato etanólico de cada fruto antioxidante sobre o radical DPPH[•] foi estimado de acordo com as recomendações de Marinova e Batchvarov (2011), que avaliaram o solvente e a relação amostra/reagente DPPH como os principais fatores que influenciam significativamente a acurácia do ensaio do DPPH. Testes preliminares empregando extrato dos frutos aquoso e hidroetanólico (1:1) apresentaram a formação de uma suspensão nas microplacas inerentes a limitação da polaridade do reagente DPPH a solventes orgânicos. Por este motivo, apenas os extratos etanólicos foram avaliados para este método.

Assim, uma solução estoque de DPPH[•] a $1,75 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução em etanol, a qual foi armazenada a 4°C , sob proteção da luz, até o momento da análise. A partir de diluições etanólicas da solução estoque, foi preparada a solução de trabalho de DPPH[•] de modo a obter para o controle (100%) uma absorbância em torno de $1,0 \pm 0,1$ unidade a 490 nm.

Resumidamente, a solução reativa (AOX) foi preparada misturando-se etanol, extrato antioxidante (formado pelo extrato da amostra) e solução de trabalho DPPH[•], na sequência e nas quantidades apresentadas na Tabela 4. Utilizou-se etanol para o branco controle (100%) e a solução formada por etanol/extrato antioxidante foi utilizada como branco da AOX a fim de eliminar interferências devido à cor das amostras. O decréscimo da absorbância foi registrado a 490 nm após a incubação por 20 min, a 25°C , 400 rpm e sob proteção da luz. Um esquema resumido do ensaio DPPH é apresentado na Figura 12.

Tabela 4 - Sequência de adição de reagentes para o método DPPH

Reagentes	AOX	Branco AOX	Controle (100%)	Branco Controle (100%)
Etanol (μL)	200	225	225	250
Extrato antioxidante (μL)	25	25	-	-
Solução de trabalho DPPH [•] (μL)	25	-	25	-
Incubação: 20 min, 400 rpm, 25°C e proteção da luz. Leitura a 490 nm.				

5.3.4.2 Método ABTS

O ensaio ABTS foi realizado de acordo com o procedimento proposto por Arnao *et al.* (2001) com algumas modificações. Para permitir a extração de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos das amostras liofilizadas, o ensaio ABTS foi aplicado em três extratos de diferentes polaridades: aquoso (solução tampão PBS 10 mmol L⁻¹, pH = 7,4), etanólico e hidroetanólico (1:1, v/v), de acordo com o procedimento de extração previamente estabelecido no item 5.2.4.

Uma solução estoque formada por ABTS 7,0 mmol L⁻¹ e K₂S₂O₈ 2,45 mmol L⁻¹ em solução tampão PBS 10,0 mmol L⁻¹ (pH = 7,4) foi previamente preparada e incubada por 12 h, à temperatura ambiente e sob proteção da luz, a fim de permitir o equilíbrio químico da reação de geração do radical cátion ABTS^{•+}.

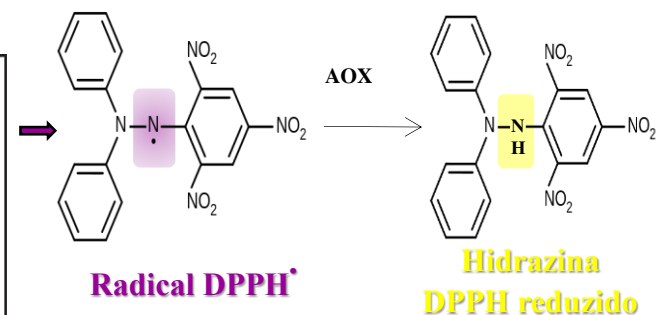
A partir de diluições da solução estoque, utilizando-se o mesmo solvente empregado nas extrações, foi preparada a solução de trabalho de ABTS^{•+} de modo a obter para o controle (100%) uma absorbância de $0,7 \pm 0,07$ unidades a 405 nm.

A solução reativa (AOX) foi preparada pela mistura da solução antioxidante (extrato dos frutos) com a solução de trabalho ABTS^{•+}, conforme mostra a Tabela 5. O solvente foi usado como branco do controle (100 %), enquanto a solução formada pelo solvente/solução antioxidante foi usada como branco dos frutos, a fim de minimizar interferências causadas pela cor das amostras. O decréscimo da absorbância foi registrado a 405 nm após incubação.



Adição de reagentes em microplaca de 96 poços

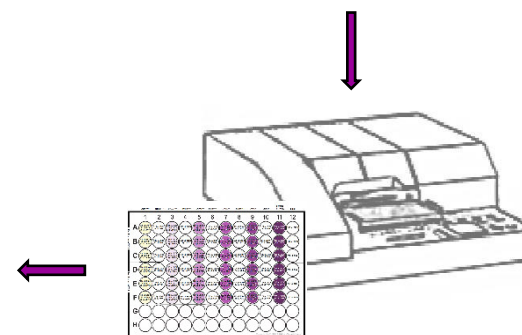
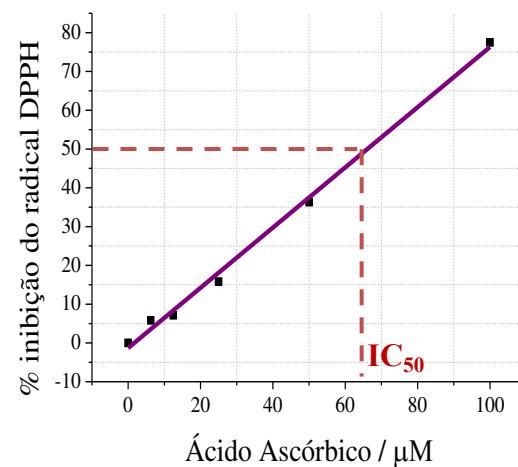
Microplaca proposta para a medida de 5 diferentes concentrações de AOX, seus brancos, bem como o controle 100% e seu branco



Incubação

20 min de reação, 400 rpm, a 25°C e protegido da luz

**Determinação da
capacidade em
inibir radicais
DPPH[•]**



Medida a 490 nm

Figura 12 - Esquema do método DPPH miniaturizado.

Tabela 5 - Sequência de adição de reagentes para o método ABTS

Reagentes	AOX	Branco AOX	Controle (100%)	Branco Controle (100%)
Solvente (μL)	-	225	25	250
Solução antioxidante (μL)	25	25	-	-
Solução de trabalho ABTS ^{•+} (μL)	225	-	225	-
Incubação: 3 min, 400 rpm e 25°C. Leitura a 405 nm.				

5.3.4.3 Método NBT

Para o ensaio NBT, o método proposto por Cortina-Puig *et al.* (2009) foi aplicado com algumas modificações. Todas as soluções foram preparadas em solução tampão de K-PBS a 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo EDTA (0,1 mmol L⁻¹) devido às condições enzimáticas requeridas. A sequência de adição de reagentes, bem como, as etapas de incubação são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Sequência de adição de reagentes para o método NBT

Reagentes	AOX	Branco AOX	Controle (100%)	Branco Controle (100%)
K-PBS (μL)	150	175	175	200
HX (μL)	25	25	25	25
Extrato antioxidante (μL)	25	25	-	-
NBT (μL)	25	25	25	25
Primeira etapa de incubação: 5 min, 700 rpm, 25°C e protegido da luz				
XOD (μL)	25	-	25	-
Etapa final de incubação: 15 min, 700 rpm, 25°C e protegido da luz. Leitura a 560 nm.				

O controle (100%) foi preparado misturando-se solução tampão K-PBS, HX a 0,75 mmol L⁻¹, NBT a 0,75 mmol L⁻¹, seguido da homogeneização (primeira etapa de incubação), adição da solução enzimática de XOD a 0,70 U mL⁻¹ e incubação final. Uma absorbância em torno de $0,28 \pm 0,02$ unidades a 560 nm é almejada para o controle (100%).

Uma mistura reacional (AOX) foi preparada com os reagentes, na sequência e quantidades informadas na Tabela 6. O branco do controle (100%) e o branco AOX foram preparados na ausência da solução enzimática, completando-se o volume final de 250 μL com solução tampão K-PBS. O decréscimo da absorbância foi registrado a 560 nm após incubação final.

5.3.5 Testes de viabilidade celular anticâncer

Linhagem de células de caco-2 foram submetidas ao tratamento e determinação da citotoxicidade frente aos extratos dos frutos amazônicos, utilizando o método colorimétrico SRB que constitui um marcador de citotoxicidade muito sensível, conforme descrito por Skehan *et al.* (1990).

SRB é usado para a determinação da densidade celular, com base na medição do conteúdo da proteína celular. O ensaio baseia-se na capacidade do corante SRB aniônico em se ligar eletrostaticamente a componentes proteicos de células que foram fixadas a placas de cultura de tecidos pelo ácido tricloroacético. SRB é um corante aminoxanteno de cor rosa brilhante com dois grupos sulfônicos que se ligam aos resíduos básicos de aminoácidos sob condições ácidas moderadas e se dissociam sob condições básicas. Como a ligação da SRB é estequiométrica, a quantidade de extrato seco das células coradas é diretamente proporcional à massa celular (SKEHAN *et al.*, 1990).

As células de caco-2 foram cultivadas em solução meio formada pelo reagente DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de penicilina (1000 U mL^{-1}), 1% de estreptomicina (1000 mg mL^{-1}) e 1% de anfotericina (250 U mL^{-1}), em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2 a 37 ° C.

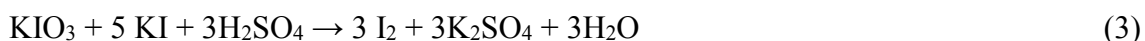
Os 96 poços da microplaca foram preenchidos com 100 μL da solução celular a uma densidade de 4×10^3 células por poço, procedendo-se à incubação a 37°C por 24 h para o crescimento celular. Nos ensaios seguintes, o meio de cultura foi substituído pelos extratos dos frutos preparados em solução meio, em concentrações que variaram de 0 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de modo a expor as células aos extratos durante 72 h. Posteriormente, o crescimento celular foi avaliado, utilizando-se o método SRB (SKEHAN *et al.*, 1990), com experimentos em quadruplicata. As células foram fixadas com 100 μL de ácido tricloroacético 500 g L^{-1} (1 h e 4°C), lavadas com água destilada e coradas com SRB a 4 g L^{-1} durante 20 min à temperatura ambiente. A fim de remover o excesso do corante

(não-ligado), procedeu-se cinco lavagens com 50 µL de ácido acético a 10 mL L⁻¹ em cada poço. As proteínas ligadas ao corante foram extraídas com 100 µL de tris base 10 mmol L⁻¹. As leituras foram realizadas a 492 nm. O controle negativo, constituído pelas células cultivadas no meio de cultura na ausência dos extratos dos frutos, correspondeu ao valor de 100% de sobrevivência. Um esquema resumido do protocolo utilizado é apresentado na Figura 13. O efeito no crescimento das células caco-2 foi expresso IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra (µg mL⁻¹) capaz de inibir 50% do crescimento celular.

5.3.6 Compostos bioativos

5.3.6.1 Determinação do teor de ácido ascórbico (Vitamina C)

A determinação do teor de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) foi realizada por titulometria de óxido-redução empregando KIO₃, conforme IAL (2008). A ação oxidante do iodo (I₂), formado pela reação entre KIO₃ e KI, oxida o C₆H₈O₆ à deidroascórbico (C₆H₆O₆). Quando todo o C₆H₈O₆ tiver reagido, o excesso de I₂, formado pela adição de mais uma gota de KIO₃ será indicado pelo amido, que adquire coloração azul na presença de I₂ livre. As reações que ocorrem podem ser expressas pelas expressões (3) e (4):



Para isto, foi tomada, em um erlenmeyer, uma massa da amostra homogeneizada que garantisse um teor de ácido ascórbico próximo a 5 mg, adicionados 50 mL de água e 10 mL de H₂SO₄ a 20% (v/v). A mistura foi homogeneizada, e a ela adicionados, sequencialmente, 1 mL de KI a 10% (m/v), 1 mL de solução de amido a 1% (m/v) e titulada com solução de KIO₃ (0,02 mol L⁻¹ ou 0,002 mol L⁻¹) até coloração azul. As análises foram realizadas em triplicada. A concentração de vitamina c foi determinada mediante a expressão (5).

$$\text{Vitamina C (mg/100g)} = \frac{100 \cdot V \cdot F}{m} \quad (5)$$

Em que: V é o volume de iodato gasto na titulação; F é 8,806 ou 0,8806 para KIO₃ 0,02 mol L⁻¹ ou 0,002 mol L⁻¹, respectivamente; m é a massa da amostra em gramas.

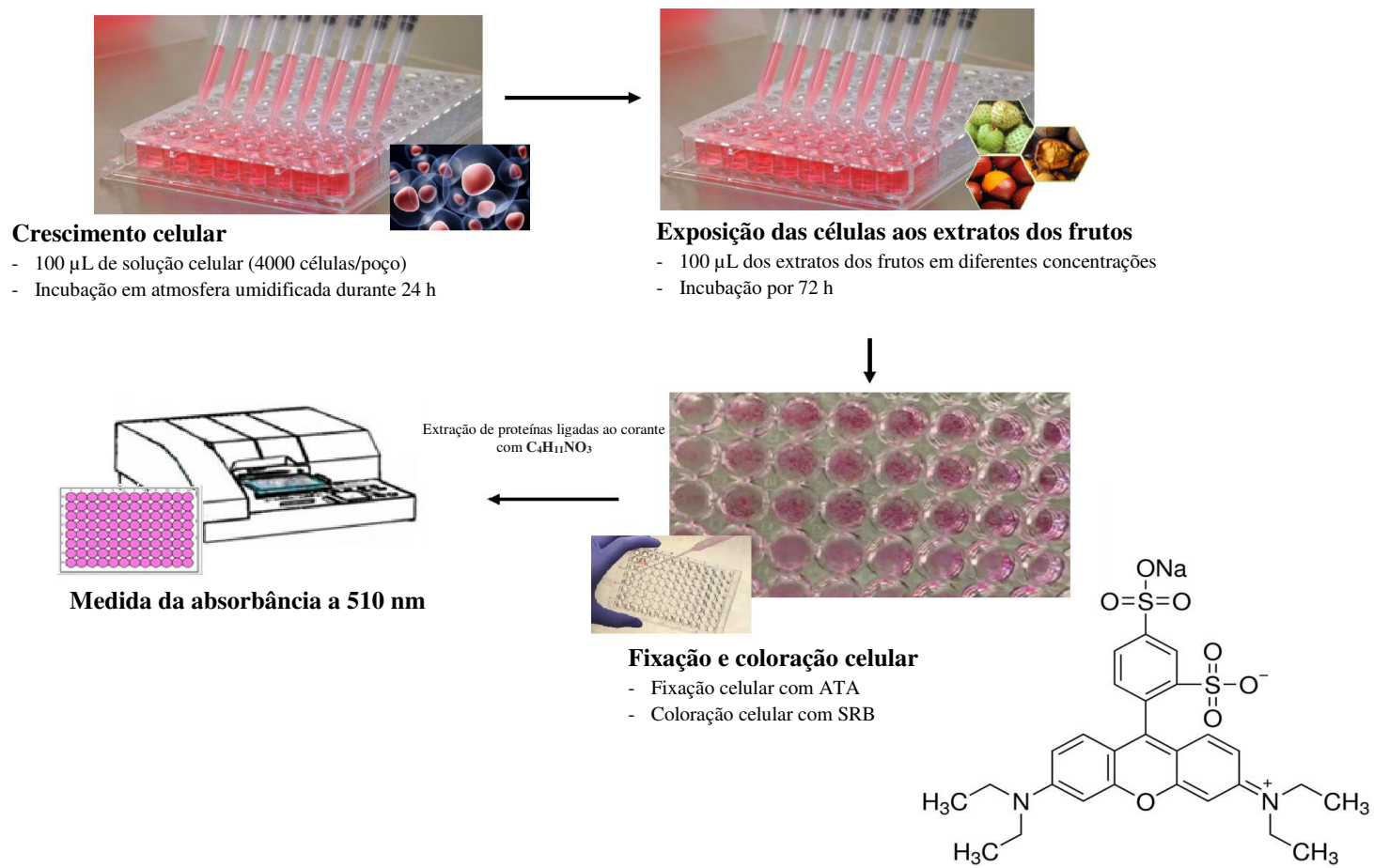


Figura 13 - Protocolo resumido do método SRB empregado.

5.3.6.2 Determinação de compostos fenólicos

5.3.6.2.1 Método Folin-Ciocalteu

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado mediante o método colorimétrico Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. Com a finalidade de extrair compostos fenólicos lipofílicos e hidrofílicos, o método Folin-Ciocalteu foi aplicado em extratos das amostras liofilizadas em diferentes polaridades, seguindo o procedimento de extração previamente otimizado e descrito no item 5.2.4. Foram empregados os extratos aquoso (solução tampão PBS 10.0 mmol L⁻¹, pH=7.4), etanólico e hidroetanólico (1:1).

O meio reacional (AOX) foi preparado pela mistura de 125 µL do reagente FC a 10% (v/v) e 25 µL do extrato antioxidante (extrato dos frutos), seguido da primeira etapa de incubação. 100 µL da solução de Na₂CO₃ a 7,8% (v/v) foi adicionado, tendo sido registrado o aumento da absorbância, a 750 nm, após 1 h de reação, que ocorreu sob abrigo de luz, 400 rpm e 37°C. O branco foi conduzido na ausência de extratos antioxidantes, adicionando-se 25 µL do solvente do ensaio, a fim de obter um volume final de 250 µL. A marcha de adições e incubações do método, adaptado às microplacas, esta apresentada na Tabela 7.

Uma curva analítica de ácido gálico na faixa de 1 a 15 µg mL⁻¹ foi construída, de modo a se obter uma absorbância de 1,0 ± 0,1 para a concentração de 15 µg mL⁻¹, medida a 750 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata em um leitor de microplacas e os resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra liofilizada.

Tabela 7 - Sequência de adição de reagentes para o método Folin-Ciocalteu

Reagentes	AOX	Branco
FC 10% (µL)	125	125
Solvente (µL)	-	25
Extrato antioxidante (µL)	25	-
Primeira etapa de incubação: 8 min, 400 rpm a 37°C		
Na ₂ CO ₃ 7,8% (µL)	100	100
Etapa final de incubação: 1 h, 400 rpm a 37°C		

5.2.6.2.2 Análises cromatográficas

Os extratos dos frutos foram submetidos à análise qualitativa por CLUE acoplado a espectrometria de massas de alta resolução, conforme proposto por Barbosa *et al.* (2018), com a finalidade inicial de se detectar os compostos fenólicos presentes. Após essa análise preliminar, amostras de biribá, inajá e monguba foram submetidas à determinação quantitativa dos compostos fenólicos.

Na etapa de extração, uma massa de 0,1 g da amostra liofilizada foi submetida à sonicação com 10 mL de uma mistura de acetona:água:ácido clorídrico (70: 29,9: 0,1 v/v/v). Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 3500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro (Hatman, Clifton, NJ, EUA) e conservado a - 4 ° C até a análise.

A fim de se obter a separação e identificação de uma maior variedade de compostos fenólicos, foram empregados dois métodos de eluição, denominados Método 1 e 2, sendo a fase móvel do Método 1 constituída da mistura de uma solução aquosa de CH₂O₂ a 0,1% (solvente A) e a fase móvel do Método 2 uma solução de C₂H₃N contendo também 0,1% de CH₂O₂ (solvente B). A eluição dos compostos procedeu-se de acordo com o seguinte gradiente de polaridade: 0-1 min, condições isocráticas a 10% de A; 1 a 20 min, gradiente linear de 10% a 95% de A; 20 a 23 min, etapa isocrática a 95% de A; 23 a 24 min de volta às condições iniciais a 10% de A; e de 24 a 30 min, condições isocráticas a 10% de A para reequilibrar a coluna. O mesmo procedimento de eluição foi empregado para o solvente B (Método 2). O fluxo da fase móvel foi de 300 µL min⁻¹ e o volume de injeção empregado (em modo *full loop*) foi de 10 µL. 53 padrões de compostos fenólicos pertencentes a diferentes famílias (ácidos fenólicos, ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, aldeídos fenólicos, terpenos fenólicos, flavonas, flavanóis, proantocianidinas e estilbenos) foram monitorados, durante a análise.

Parâmetros incluindo tempo de retenção cromatográfica, erros de massa, padrões isotópicos e espectros de íons produto com energias de colisão normalizadas foram usados para fins de identificação e confirmação.

5.3.7 Análises quimiométricas

O software Origin Pro 8.6 foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA), seguidas do teste Tukey a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as concentrações, sendo aceita significância $p < 0,05$. Para avaliar a correlação entre os parâmetros foi empregada a técnica de regressão linear.

Foi feita uma Análise de Componentes Principais (PCA), onde os dados foram previamente auto escalonados, de modo a se atribuir o mesmo peso a todas as variáveis. As análises químicas foram realizadas em triplicata, para a construção da matriz de dados 23x30 (vinte e três variáveis e dez amostras, em triplicata).

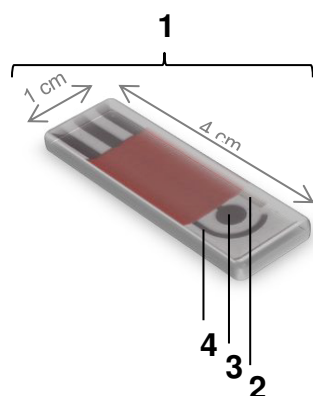
5.4 Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Determinação da Capacidade Antioxidante

Um biossensor amperométrico capaz de medir a capacidade antioxidante de amostras vegetais naturais ou processadas contra as EROs H_2O_2 e radicais $O_2^{\cdot-}$ foi desenvolvido neste estudo.

5.4.1 Sensor serigrafado

Foi empregado um sistema convencional formado por 3 eletrodos impressos em uma placa fina de policloreto de vinila (PVC) transparente, que constituiu o sensor eletroquímico. Tal sensor foi serigrafado em uma máquina de impressão semiautomática (DEK 248). A Figura 14 mostra o sensor (1), no qual foram impressos os seguintes eletrodos: eletrodo de referência (2), eletrodo de trabalho (3) e eletrodo auxiliar (4). As figuras B6 e B7 (Anexo B) elucidam a produção dos sensores, empregando uma máquina de serigrafia.

No sensor (1), o pseudoeletrodo de referência (2) foi constituído de uma linha reta com 5x1,5 mm de diâmetro, sendo formado por uma mistura (pasta) de Ag/AgCl. O eletrodo de trabalho foi constituído de um disco de 4 mm de diâmetro, formado por uma pasta de grafite comercial contendo o sal azul da Prússia como modificador. O eletrodo auxiliar, formado de uma linha curva com 16x1,5 mm, continha somente a pasta de grafite comercial.



- 1 – Sensor serigrafado**
- 2 – Pseudoeletrodo de referência**
- 3 – Eletrodo de trabalho (WE)**
- 4 – Eletrodo auxiliar**

Figura 14 - Sensor serigrafado.

Neste estudo, uma concentração fixa de KCl foi estabelecida, ao preparar todas as soluções em solução tampão fosfato (K-PBS) pH 7,5. O tampão continha K_2HPO_4 33,33 mmol L⁻¹, KH_2PO_4 16,67 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹. Além de manter a atividade enzimática, a solução tampão foi usado como eletrólito e reflete condições de pH e salinidade que se aproximam das fisiológicas.

5.4.2 Imobilização enzimática e otimização

A enzima XOD foi imobilizada sobre a superfície do eletrodo de trabalho por aprisionamento com o polímero PVA-AWP. Para o procedimento de imobilização, foi preparada uma mistura homogênea contendo a solução enzimática da enzima XOD e PVA-AWP. Um volume de 3 µL da mistura foi depositado, com auxílio de uma micropipeta para líquidos viscosos (marca Gilson), sobre a superfície do eletrodo de trabalho. O eletrodo foi mantido sob luz fria de neônio a 4°C (15 W), de forma a permitir a polimerização, e o consequente aprisionamento da enzima no eletrodo de trabalho.

O procedimento de imobilização foi otimizado mediante construção de diagramas de superfície de resposta. A fim de assegurar as melhores condições de biofuncionalização do sensor, as variáveis otimizadas foram: carga da enzima XOD (C_{xod}), razão enzima:polímero (R_{XP}) e tempo de foto polimerização (T_p). O programa *Box-Behnken Design* foi utilizado, considerando-se 3 fatores e 3 níveis: C_{xod} (5, 8 e 10 mU/ WE), R_{XP} [1:2 (ou 0,33); 1:1 (ou 0,50); e 2:1 (ou 0,66)] e T_p (48, 24 e 0,5 h). 15

conjuntos de experimentos fatoriais fracionários foram construídos pelo referido programa estatístico.

5.4.3 Princípio do biossensor e medições amperométricas

O princípio de detecção foi baseado na medição do H_2O_2 gerado como produto final da reação enzimática entre a HX e a enzima XOD, ou por dismutação espontânea dos radicais $\text{O}_2^\bullet$. O H_2O_2 formado enzimaticamente foi reduzido na superfície do eletrodo polarizado ($E = -100 \text{ mV vs Ag/AgCl}$), tendo sido a corrente gerada proporcional à sua concentração. Como os antioxidantes inibem tais EROs, a sua presença induz à diminuição da corrente catódica, permitindo assim a avaliação da capacidade antioxidante.

Todas as medidas amperométricas foram realizadas em células de vidro escuras de 10 mL de capacidade, à temperatura ambiente e sob agitação magnética a 300 rpm. O biossensor foi previamente avaliado, mergulhando-o na célula contendo 10 mL de solução tampão K-PBS, pH= 7,5, e medindo-se em seguida a corrente gerada, a um potencial de trabalho fixo de $-100 \text{ mV vs Ag/AgCl}$, o qual corresponde à redução do H_2O_2 gerado. A intensidade da corrente inicial foi registrada após o intumescimento do PVA-AWP, seguido de estabilização do sinal, num tempo total de aproximadamente 50 min.

Como controle negativo, empregou-se a produção de EROs sem sua neutralização por antioxidantes. Brevemente, um volume de $20 \mu\text{L}$ de HX 5 mmol L^{-1} foi adicionado à solução tampão K-PBS e, após cada adição do substrato HX e estabilização do sinal (em geral 60 s), a intensidade da corrente gerada foi registrada. Uma curva analítica da intensidade da corrente em função da concentração da HX foi construída e o coeficiente angular registrado (m_a).

Em seguida, uma nova curva analítica de concentrações crescentes de HX foi construída, mas na presença da solução antioxidante (padrões ou amostras). As EROs produzidas (H_2O_2 e $\text{O}_2^\bullet$) foram capturadas por antioxidantes presentes, induzindo à diminuição da intensidade da corrente. Como consequência, um menor valor de inclinação foi obtido (m_b) e registrado. A capacidade antioxidante foi então expressa pelo percentual de inibição das EROs através da comparação dos coeficientes angulares

obtidos nas curvas construídas na ausência e presença de antioxidantes, de acordo com a expressão 6.

$$\text{Capacidade antioxidante (\%)} = 100 \cdot [1 - (m_b/m_a)] \quad (6)$$

5.4.4 Análise de amostras reais e antioxidante de referência

Amostras de frutos não autóctones *in natura* (morango, laranja e maracujá) e polpa de frutos amazônicos (graviola, bacuri e murici) foram adquiridos nos supermercados da cidade de São Luís, MA, Brasil (Vide Figura B8, do Anexo B). Após lavagem dos frutos, foram preparados néctares das polpas a 10% (v/v) e refresco dos frutos *in natura* a 25% (v/v), ambos em solução tampão K-PBS.

A capacidade antioxidante para cada fruto foi determinada conforme descrito no item 5.4.3. Ácido gálico foi utilizado como antioxidante de referência.

5.4.5 Caracterização eletroquímica e eficiência analítica do biossensor

Foram adotadas as seguintes figuras de mérito para avaliar a eficiência analítica do biossensor desenvolvido: *precisão*, expressa por meio do CV; *sensibilidade absoluta*, expressa pela inclinação da curva analítica (m); *linearidade*, expressa como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade (ou inclinação) pode ser considerada constante, e *sensibilidade relativa*, expressa pelos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Os valores de LOD foram obtidos da razão entre o desvio padrão de 10 determinações (medidas do branco) e a inclinação da curva analítica (m), multiplicada pelo fator 3; para o LOQ, multiplica-se pelo fator 10 (INMETRO, 2016).

Para dar maior evidência à precisão do método empregando o biossensor, foi construída uma carta de controle estatístico, que determina os limites de advertência e ação (superiores e inferiores). O limite de advertência constitui-se do valor $\mu \pm 3\sigma$ e o limite de ação, do valor $\mu \pm 10\sigma$, onde μ = média das determinações e σ = desvio padrão. Isso foi feito para monitorar o desempenho das medidas efetuadas pelo biossensor (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos Frutos Amazônicos Estudados

Nesse trabalho, contribuiu-se para o conhecimento das propriedades nutricionais, antioxidantes e bioativas de dez frutos nativos da região amazônica, que foram selecionados e adquiridos *in natura* nos estados do Amazonas, Maranhão e Roraima, nos locais de coleta apresentados no mapa (Figura 15), o qual foi construído a partir das coordenadas geográficas apresentadas na Tabela 1.

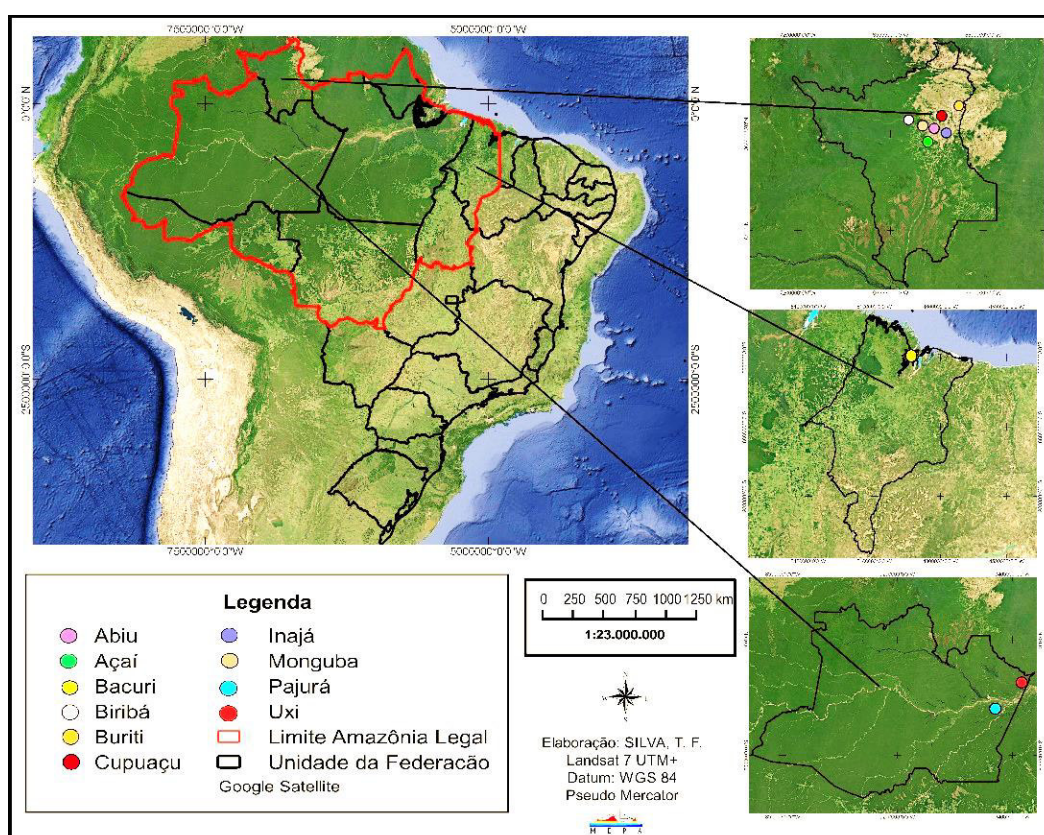


Figura 15 - Mapa com a localização geográfica dos locais de coleta.

Informações sobre o período de frutificação de frutos são fundamentais pois permitem prever os períodos de reprodução das plantas, seus ciclos de crescimento, o período para obtenção de frutos e também sementes para fins silviculturais, além de outras características de grande valia no manejo florestal, ambiental, para especialistas da área da saúde e para os consumidores em geral (Figura 16).

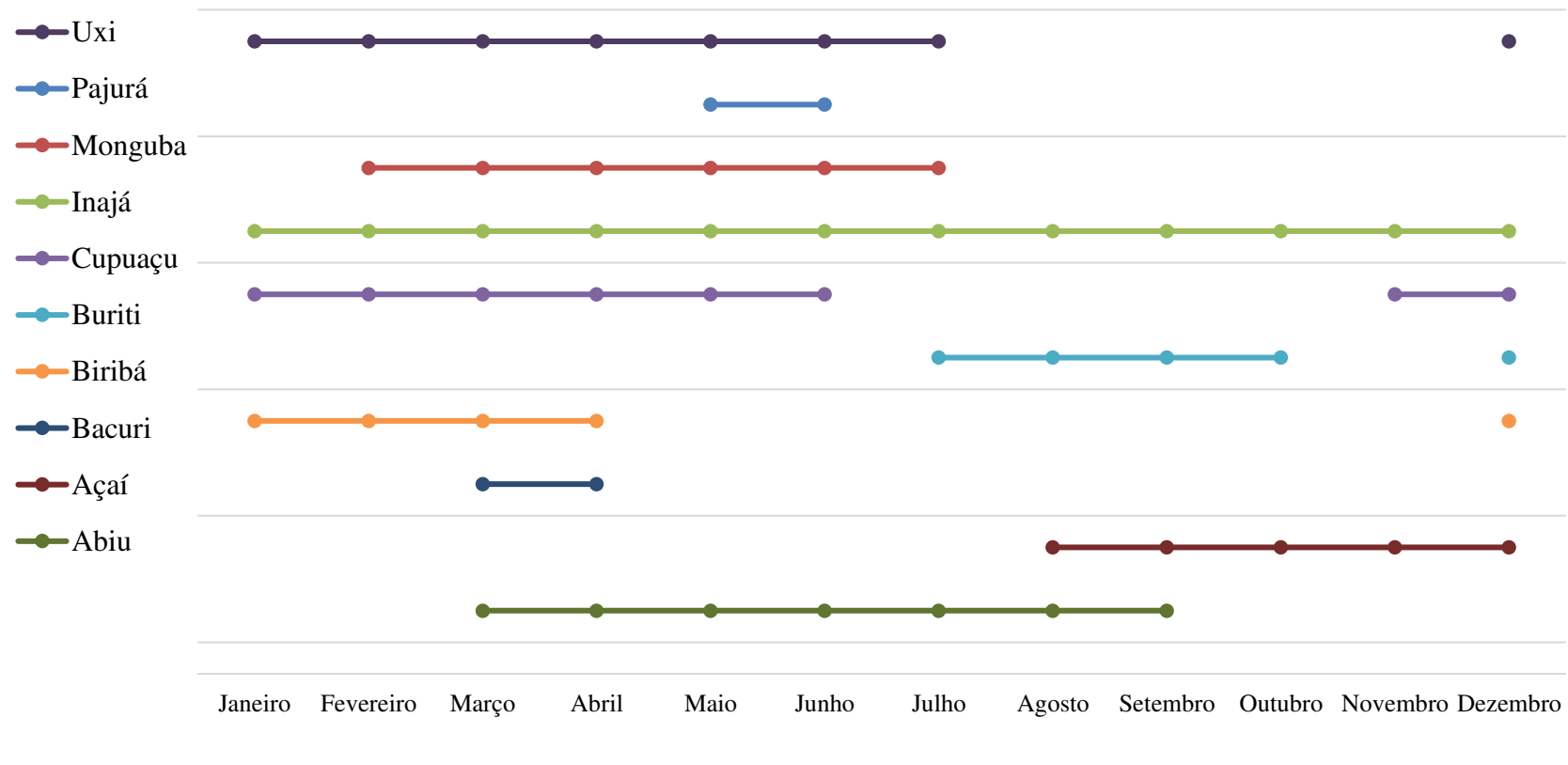


Figura 16 - Sazonalidade de frutificação dos frutos amazônicos sob estudo ao longo do ano.

A Figura 16 mostra informações sobre o período da formação dos frutos das plantas avaliadas neste estudo, a qual foi construída através da compilação das épocas de frutificação apresentadas na literatura (BRASIL, 2015; FALCÃO; LLERAS; KERR, 1981; RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011). Os dados da sazonalidade de frutificação, quando confrontado com informações sobre as propriedades nutricionais, antioxidantes e bioativas, contribuem na indicação de fontes de aporte de nutrientes aos seres humanos e outros animais no decorrer de cada ano.

6.1.1 Caracterização bromatológica dos frutos

A caracterização bromatológica de alimentos brasileiros tem sido estimulada para reunir informações, atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional. O conhecimento da composição de alimentos é, pois, de suma importância para avaliação nutricional e adequação da dieta alimentar de indivíduos, de populações e, também, para o planejamento agropecuário e para a indústria de alimentos (ARAGÃO, 2013).

Os resultados obtidos da caracterização físico-química para os frutos contemplados neste estudo são apresentados na Tabela 8. Observa-se elevada precisão dos resultados, com coeficientes de variação (CVs) inferiores a 11,8%.

Avaliando-se o parâmetro umidade, a maioria dos frutos apresentou teores superiores a 60%, com exceção da polpa do buriti (55,9%) e uxi (31,7%). Diante disso, espera-se que as polpas de buriti e uxi sejam menos sujeitas à perda de sua qualidade com o tempo, tendo em vista que a umidade reflete o teor de água ligada e livre presente no fruto, e esta última é a responsável por servir de meio de cultivo para microrganismos que provocam alterações indesejáveis (BOLZAN, 2013). Por outro lado, esses dados podem contribuir tanto com o consumidor quanto com a indústria, por ocasião da escolha de um fruto com elevado teor de água, na dieta e na formulação de produtos que exijam tal característica. Comparando-se os teores de umidade com a literatura, observa-se certa concordância aos reportados para as polpas de uxi (MARX *et al.*, 2002; BERTO *et al.*, 2015a), abiu (LOVE; PAUL, 2011), biribá, pajurá, bacuri (BERTO *et al.*, 2015a), açai (NASCIMENTO, 2008), buriti (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011), cupuaçu (TACO, 2011), inajá (BEZERRA *et al.*, 2006) e para as amêndoas de monguba (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Tabela 8 - Caracterização físico-química dos frutos *in natura*

Frutos Amazônicos	Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Carboidratos	AA* Cítrico	Energia Kcal 100g⁻¹	pH
	g 100g⁻¹							
Abiu	71,7 (0,2) ^a	0,3 (9,3) ^a	0,3 (3,6) ^a	0,2 (4,3) ^a	27,4	0,06 (5,0) ^a	113,4	6,8 (0,6) ^a
Açaí	88,2 (1,9) ^b	0,7 (10,5)	4,3 (0,4) ^b	0,7 (7,2)	6,1	0,08 (6,6) ^a	66,3	5,7 (0,3) ^b
Bacuri	91,2 (0,2)	0,2 (11,7) ^a	0,4 (9,9) ^a	0,3 (2,1) ^{a,b}	7,9	0,6 (5,5)	36,2	3,7 (1,4) ^c
Biribá	89,5 (8,2)	2,1 (8,3)	0,06 (6,2) ^a	1,0 (9,2) ^c	7,4	0,2 (5,6) ^{a,b}	34,2	5,8 (4,6) ^b
Buriti	55,9 (0,3)	1,3 (1,2) ^b	21,0 (0,5)	2,1 (5,9) ^d	19,7	0,9 (1,1)	276,3	3,8 (8,4) ^c
Cupuaçu	82,3 (0,3) ^b	1,1 (3,1) ^c	0,6 (10,6) ^a	0,4 (2,5) ^b	15,6	1,8 (9,7)	69,2	4,1 (0,5) ^{c,d}
Inajá	67,5 (0,1) ^{a,c}	1,2 (1,0) ^{b,d}	4,3 (8,6) ^b	0,5 (1,5) ^b	25,5	0,07 (4,7) ^a	146,5	5,7 (0,4) ^b
Monguba	70,4 (1,2) ^a	1,4 (1,7) ^{b,d}	18,7 (7,0)	2,4 (5,2)	7,2	0,3 (8,7) ^c	206,5	6,7 (3,4) ^a
Pajurá	63,0 (0,5) ^c	0,9 (3,1)	0,1 (10,8) ^a	0,9 (0,8) ^c	35,0	0,2 (10,6) ^{a,b}	144,8	5,5 (3,8) ^b
Uxi	31,7 (2,5)	1,2 (3,8) ^{b,c,d}	23,3 (11,8)	2,2 (4,9) ^d	41,7	0,2 (6,9) ^{b,c}	384,7	4,4 (3,7) ^d

Resultados obtidos em base úmida. Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação (CV, %): precisão das medidas. Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. *AA=Acidez em ácido.

O conteúdo de cinzas mostrou-se inferior a < 2,1% para todas as amostras, sendo que a polpa de biribá revelou possuir o maior conteúdo mineral.

As polpas de uxi e buriti e as amêndoas de monguba apresentaram os maiores teores em lipídeos (18,7 a 23,3%) e proteínas (2,1 a 2,4%). No presente estudo, foi observada uma forte correlação positiva ($R^2 = 0,92$) entre estes dois parâmetros.

Alguns estudos reportaram faixas de teores de lipídeos para a polpa de uxi (10 a 31%) (MARX *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2006), apresentando uma certa concordância com os obtidos aqui. A classificação nutricional aceita até hoje no Brasil (BRASIL, 1998) permite qualificar as polpas de abiu, bacuri, biribá, cupuaçu e pajurá como sendo de baixo conteúdo lipídico (<3 g 100g⁻¹).

As concentrações de proteínas obtidas para as polpas de abiu e cupuaçu foram inferiores às reportadas pelo Departamento de Atenção Básica do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). O mesmo aconteceu em relação ao fruto inajá e a semente de monguba, quando se comparam os estudos desenvolvidos por Mota e França (2007) e Azevedo (2008), respectivamente. Já para as polpas dos frutos de açaí, biribá e buriti, os resultados encontrados nesse estudo concordam bastante com os apresentados nos trabalhos de Yuyama *et al.* (2011), Berto *et al.* (2015a); Morton (1987) e Manhães e Sabaa-Srur (2011), respectivamente. Para as polpas de pajurá e uxi os resultados se mostraram superiores aos reportados por Berto *et al.* (2015a).

Embora não sejam reconhecidas como fontes proteicas, a inclusão de proteínas vegetais na dieta humana, proveniente dos frutos estudados, pode trazer diversos benefícios à saúde em relação às proteínas animais, uma vez que são isentas de gorduras saturadas e aditivos químicos, auxiliam o trânsito intestinal, possuem uma elevada densidade nutritiva e um menor impacto ambiental em sua produção (MOURE *et al.*, 2006).

O principal papel dos carboidratos é fornecer energia para as células do corpo. Em relação à porcentagem de carboidratos nos frutos estudados, o maior teor foi encontrado na polpa de uxi (41,7%).

De modo geral, observou-se uma correlação linear negativa entre o teor de umidade e os valores de lipídeos, proteínas, carboidratos e energia ($R^2 = -0,74$; $-0,62$; $-0,84$; $-0,95$, respectivamente). Isso foi influenciado principalmente pelo conteúdo hídrico que, em geral, representou a maior porcentagem na constituição dos frutos, seguido dos teores de carboidratos, lipídios, proteínas e minerais (BOLZAN, 2013).

O conteúdo calórico esteve diretamente relacionado aos teores de lipídeos, proteínas e carboidratos nas amostras ($R^2 = 0,90; 0,78; 0,64$, respectivamente). Todas elas apresentaram valor energético superior a 40 Kcal $100g^{-1}$, exceto as polpas de bacuri e biribá, as quais podem ser classificadas como alimentos de baixo valor energético (BRASIL, 1998). Tais frutos podem, portanto, ser indicados para dietas de restrição energética; os demais, para dietas hipercalóricas.

Apesar do maior valor de pH e o menor teor de acidez em ácido cítrico terem sido observados na polpa de abiu (6,8 e 0,06 g $100g^{-1}$, respectivamente), com uma certa correlação negativa ($R^2 = -0,63$) entre estes parâmetros, observou-se que nem sempre um valor de pH alto levou a um baixo teor de acidez em ácido cítrico. Isso é facilmente explicado em termos analíticos, haja vista que a medida de pH indica a quantidade de íons H^+ livres, enquanto que a acidez titulável mede a concentração total de íons H^+ (ligados e livres) (IAL, 2008).

A maioria dos frutos contemplados aqui possui uma densa composição nutricional, o que tem sido muito importante na dieta da diversidade animal da região amazônica, dentro da sua sazonalidade de ocorrência (Figura 16) e, conseqüentemente no seu equilíbrio; contudo, muitos desses frutos ainda são pouco utilizados na dieta alimentar brasileira.

6.1.2 Composição mineral dos frutos

Os resultados das concentrações dos minerais (mg $100g^{-1}$, massa úmida) nos frutos são apresentados na Tabela 9. A tabela também apresenta, como figura de mérito que caracteriza a exatidão do método analítico, os índices de recuperações (%); para caracterizar a precisão, tem-se os valores dos coeficientes de variação (CVs, %), e para caracterizar a sensibilidade, foram apresentados os valores dos limites de detecção (LODs) e de quantificação (LOQs), em mg L^{-1} . Deste modo, a Tabela 9 evidencia que essa etapa do trabalho teve a preocupação não só de mostrar os resultados dos teores dos minerais presentes nas amostras, mas também de caracterizar o rigor do método analítico.

Tabela 9 - Teores minerais nos frutos amazônicos estudados e figuras de mérito do método analítico empregado

Elemento mineral	Ca	Li	Na	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	
	LOD (mg L ⁻¹)	6,5 10 ⁻²	0,1 10 ⁻³	1,0 10 ⁻¹	2,0 10 ⁻³	4,0 10 ⁻⁴	5,0 10 ⁻⁴	7,1 10 ⁻⁶	3,0 10 ⁻⁴
	LOQ (mg L ⁻¹)	2,4	0,4 10 ⁻³	3,5	2,2 10 ⁻²	1,7 10 ⁻³	2,9 10 ⁻³	1,2 10 ⁻⁵	1,7 10 ⁻³
Frutos Amazônicos	CONCENTRAÇÃO mg 100g ⁻¹								
Abiu	9,5 (6,2) ^a	3,6 (13,6) ^a	44,4 (8,6)	8,3 (8,2) ^a	0,2 (7,0) ^a	0,3 (10,8) ^{a,b}	0,08 (7,1) ^{a,b}	0,3 (9,3) ^{c,d}	
Açaí	61,5 (6,2)	15,3 (5,7)	4,1 (3,4) ^a	12,6 (4,7)	0,1 (5,8) ^{b,c,d}	0,8 (1,3) ^c	7,9 (3,5)	1,0 (3,9) ^a	
Bacuri	7,0 (5,0) ^a	1,7 (5,0)	13,6 (5,2)	7,0 (5,0) ^a	0,2 (9,6) ^{a,b}	0,2 (8,1) ^a	0,02 (6,9) ^b	0,6 (8,9) ^b	
Biribá	34,4 (3,8)	9,1 (3,8)	1,1 (4,5) ^a	25,8 (8,7)	0,09 (5,3) ^{b,d}	0,2 (4,1) ^{a,d}	0,1 (5,2) ^{a,b}	0,2 (10,2) ^c	
Buriti	107,1 (1,6)	28,3 (1,6)	3,0 (5,9) ^a	84,3 (3,1) ^b	0,2 (2,2) ^{a,c}	0,9 (1,9) ^c	3,2 (4,1)	0,9 (2,6) ^a	
Cupuaçu	17,5 (8,0) ^b	4,2 (8,8) ^{a,b}	1,2 (1,5) ^a	36,3 (6,2)	0,1 (5,7) ^{b,d}	0,3 (5,1) ^{a,e}	0,1 (5,6) ^{a,b}	0,3 (7,4) ^d	
Inajá	19,8 (7,7) ^{b,c}	5,1 (7,5) ^c	4,2 (5,9) ^a	57,5 (8,2)	0,08 (9,1) ^d	0,5 (1,6) ^{b,e}	0,2 (7,0) ^a	1,1 (4,0)	
Monguba	55,9 (4,1)	14,3 (3,9)	1,1 (2,1) ^a	87,5 (5,0) ^b	0,8 (6,2)	0,4 (9,9) ^{b,d,e}	0,2 (8,5) ^a	1,0 (8,3) ^a	
Pajurá	19,2 (4,0) ^{b,d}	5,0 (3,9) ^{b,c}	68,6 (6,7)	21,3 (2,2)	0,1 (9,4) ^{a,b,d}	0,4 (4,8) ^{a,e}	0,2 (2,4) ^a	0,7 (6,6) ^b	
Uxi	22,3 (6,2) ^{c,d}	5,5 (5,5) ^c	2,9 (10,0) ^a	40,7 (1,4)	0,3 (7,5)	1,2 (5,8)	0,7 (2,8)	0,5 (6,1)	
Ensaio de Fortificação	RECUPERAÇÃO %								
Biribá	93,1 (2,9)	70,0 (2,7)	108,6 (1,6)	107,3 (0,8)	110,5 (0,6)	101,5 (6,6)	97,2 (1,2)	116,5 (4,9)	
	103,1 (11,1)	112,0 (10,5)	108,1 (4,9)	109,6 (1,6)	106,6 (3,1)	102,6 (5,0)	103,2 (7,7)	109,5 (7,7)	
Buriti	107,1 (9,9)	98,1 (2,4)	107,2 (4,0)	108,3 (1,6)	107,8 (5,9)	97,0 (8,0)	100,0 (11,8)	109,5 (7,4)	
	104,5 (8,9)	101,1 (7,1)	100,9 (1,3)	88,5 (7,0)	102,9 (2,1)	98,0 (2,5)	100,0 (0,0)	90,3 (3,3)	
Uxi	102,0 (5,8)	85,6 (16,5)	102,8 (5,3)	110,6 (1,6)	106,5 (10,0)	107,3 (6,9)	100,3 (2,4)	112,0 (12,9)	
	98,1 (4,2)	82,8 (8,5)	96,6 (2,5)	103,6 (3,6)	103,5 (1,6)	103,2 (7,0)	95,4 (2,8)	101,5 (3,0)	

Resultados obtidos em base úmida. Ca = cálcio; Li = lítio; Na = sódio; Mg = magnésio; Cu = cobre; Fe = ferro; Mn = manganês; Zn = zinco. Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação (CV, %): precisão das medidas. LOD (limite de detecção) e LOQ (limite de quantificação): sensibilidade do método analítico. Resultados com base na massa úmida. Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Após as análises, os resultados encontrados serviram para se realizar uma avaliação nutricional dos frutos, com base no Relatório Técnico do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998). Tal documento oficial divide os alimentos em duas classes: 1) alimento como fonte em determinado mineral, quando 100 g deste apresentar de 15 a 29% de sua ingestão diária recomendada (IDR), e 2) alimento com alto teor mineral, quando 100 g deste apresentar mais que 30% da sua IDR. Os resultados da classificação das matrizes estudadas de acordo com os IDRs estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores da ingestão diária recomendada (IDR) em minerais para um adulto saudável

Elementos	IDR (mg dia ⁻¹)	Amostras	% IDR atendido	Classificação
Mg	260 ^a	Buriti	32,4	Alto teor
		Inajá	22,1	Fonte
		Monguba	33,7	Alto teor
		Uxi	15,6	Fonte
Cu	0,9 ^a	Abiu	22,3	Fonte
		Bacuri	17,7	Fonte
		Buriti	21,3	Fonte
		Monguba	83,0	Alto teor
		Pajurá	15,6	Fonte
		Uxi	35,7	Alto teor
Fe	8 ^b	Uxi	15,0	Fonte
Mn	2,3 ^a	Açaí	342,9	Alto teor
		Buriti	138,5	Alto teor
		Uxi	29,0	Fonte

Mg = magnésio; Cu = cobre; Fe = ferro; Mn = manganês. Porcentagem da IDR contemplada em 100 g em massa úmida das amostras e suas classificações minerais. Fontes: ^aBRASIL, 2005; ^bINSTITUTE OF MEDICINE, 2006.

Avaliando-se os resultados das concentrações, observa-se que os valores dos CVs estão abaixo de 10% para a maioria das determinações, indicando a precisão dos resultados.

Os resultados das recuperações obtidas nos dois níveis de concentrações adicionados, para a maioria dos elementos minerais e amostras, encontram-se na faixa de 90 a 110%, exceto para o elemento Li nas amostras de biribá e uxi. Tais resultados indicam alta exatidão na maioria das análises, devido à inexistência de perdas ou contaminações no decorrer dos procedimentos, seja nas etapas de bancada, seja na determinação final dos elementos por ICP OES.

O maior teor de cálcio (Ca) foi obtido na polpa de buriti (107,1 mg 100g⁻¹), seguido de açaí e monguba. Os grupos de frutos cujas concentrações de Ca não apresentaram diferenças significativas foram: 1) abiu e bacuri; 2) cupuaçu, inajá e pajurá; 3) inajá e uxi, e 4) pajurá e uxi. Com esses resultados, é possível estabelecer uma dieta balanceada, sem sobreposições de frutos com mesma contribuição em relação ao mineral cálcio, essencial para a formação dos ossos e prevenção de doenças degenerativas dos ossos, notadamente a osteoporose.

Uma certa correlação positiva ($R^2=0,63$) foi observada entre os teores de cálcio e magnésio (Mg), fato que possivelmente deve-se à absorção e distribuição metabólica controladas e similares destas espécies químicas na nutrição das plantas, aliada a uma disponibilidade do meio de produção equilibrada (SALVADOR; CARVALHO; LUCCHESI, 2011). Correlação negativa poderia ser esperada se houvesse um desequilíbrio na absorção dos minerais Ca e Mg biodisponíveis, uma vez que a absorção pelo vegetal em excesso de um desses elementos resultaria na diminuição da absorção do outro, com consequente diminuição no desenvolvimento vegetal (SALVADOR; CARVALHO; LUCCHESI, 2011).

Para o elemento lítio (Li), as recuperações estiveram na faixa de 70,0-112,0% no fruto biribá, enquanto que para as amostras de buriti e uxi as faixas de recuperação foram de 98,1-101,1% e 82,8-85,6%, respectivamente. Isso evidenciou a variabilidade dos resultados para o Li entre as matrizes, mas sempre dentro dos limites aceitáveis. Os resultados para a amostra de buriti, por exemplo, estiveram dentro de um intervalo ótimo de exatidão (INMETRO, 2016; BRITO *et al.*, 2003).

A literatura de referência relacionada às análises de minerais empregando métodos espectrométricos, como aqueles baseados na técnica IPC OES reporta algumas interferências espectrais durante a análise de Li. Isso ocorre devido à sobreposição de espectros interelementares, durante a etapa de atomização por plasma, especialmente devido à presença dos elementos sódio (Na), potássio (K), Ca e Mg, dos íons Cl⁻ (cloreto) e PO₄³⁻ (fosfato), e das moléculas de etanol e glicose, presentes nas amostras (SAMPSON; RUDDER; ELLIN, 1994; MISRA; FROELICH, 2009; BOND; CANTERFORD, 1971; ZERBINATI; BALDUZZI; DELL'ORO, 2000; SHALMI *et al.*, 1994; ROCKS; SHERWOOD; RILEY, 1982; VANHOE; DAMS; VERSIECK, 1994).

A fim de evitar tais interferências e obter o máximo de sensibilidade do método, no presente trabalho foram testados diferentes valores de comprimento de onda (λ):

323,261 nm, 670,784 nm e 610,364 nm, sendo este último o que resultou em melhores recuperações. Interferências de matriz, ou seja, aquelas causadas pelas substâncias que compõem a amostra, também são reportadas na determinação de Li (SAMPSON; RUDDER; ELLIN, 1994; MISRA; FROELICH, 2009). Neste sentido, concluiu-se aqui que, para determinação do Li em amostras de alimento por ICP OES, sempre será necessária a realização de estudos de interferências espectrais e de matriz.

A concentração de Li encontrada nas amostras frescas de frutos amazônicos variou de 1,7 a 28,3 mg 100g⁻¹. Fazendo-se uma comparação com outros frutos também consumidos na região, o fruto abricó do norte (9,5 mg 100g⁻¹), também amazônico, está dentro da faixa dos valores obtidos neste estudo. Realizou-se também uma comparação desses resultados com o teor de Li reportado para a maçã, uma fruta não autóctone que foi paulatinamente introduzida na alimentação dos brasileiros, sendo igualmente apreciada pelos amazonenses e nortistas. Tal fruto apresenta teores bem superiores de Li (35 mg 100g⁻¹) em sua composição (VAITSMAN; VAITSMAN; AZEVEDO, 1991).

A exigência diária mínima de lítio têm sido motivo de divergências. Apesar de Schrauzer (2002) defender ser 1 mg dia⁻¹, Marshall (2015) estima a necessidade de quantidades maiores, por considerar que existem diferenças individuais que podem exigir ingestão maior para uma saúde ideal, levando em conta ainda a perda de energia diária, que é diferente para cada indivíduo. A EPA estimou uma ingestão dietética diária de Li nos EUA entre 0,6 a 3,1 mg (SAUNDERS, 1985). Nos Andes, ao norte da Argentina, o consumo diário estimado é de 2 a 30 mg (CONCHA; BROBERG; GRANDÉR, 2010). Na França, estimou-se um consumo médio diário de Li de 11 µg (NOËL; LEBLANC; GUÉRIN, 2003). Sabe-se que mecanismos muito diferentes governam altas e baixas doses de Li e que somente em doses muito altas, cerca de 50 a 300 vezes maior do que a ingestão dietética natural de alimentos e água, o lítio atua como uma droga (NOËL; LEBLANC; GUÉRIN, 2003). Na região amazônica não são ainda conhecidos os valores basais para o Li. Além disso, considerando-se as possíveis interferências espectrais e de matriz observadas por ocasião da determinação do mineral, os valores reportados no presente estudo representam dados a serem avaliados com o progresso da pesquisa com esse mineral.

O maior teor em Na foi obtido para a amostra de pajurá, seguida do abiu e bacuri. Os demais frutos não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$, 95% de confiança) entre si, em relação às concentrações de Na. A ingestão de 100 g das partes comestíveis dos frutos

estudados poderá fornecer quantidade de Na inferior a 15% da IDR. Isso pode ser considerado um dado excelente, do ponto de vista nutricional, considerando as ações atuais em todo o mundo, desenvolvidas por órgãos de saúde pública, em busca da conscientização com foco na redução desse mineral na dieta da população. Tais ações têm como causa o aumento na incidência de hipertensão, comprometimento dos rins e do coração causados pela ingestão em excesso de Na (WHO, 2012; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

Os maiores teores de Mg foram obtidos para as amostras de monguba e buriti, cujos teores não apresentam diferenças significativas entre si. Da mesma maneira, para as polpas de abiu e bacuri não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para este mineral. Na nutrição mineral de plantas, o Mg se destaca por suas funções na fotossíntese, na síntese de lipídeos e na ativação de enzimas que integram o metabolismo das proteínas (FAQUIN, 2005). Este fato possivelmente explica a correlação positiva observada, no presente estudo, entre os teores de Mg e as macromoléculas de lipídeos ($R^2 = 0,74$) e proteínas ($R^2 = 0,75$).

O Mg é um mineral importante na saúde humana por participar de quase todas as ações anabólicas e catabólicas, como no metabolismo energético e proteico, glicólise e síntese de adenosina trifosfato. A deficiência de Mg está relacionada a diversas doenças, tais como doenças cardiovasculares, pré-eclâmpsia/eclâmpsia, hipertensão, AVC, diabetes mellitus, asma brônquica, além de seu possível envolvimento na enxaqueca, na osteoporose, no alcoolismo e nos distúrbios do sistema imunológico (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; LUKASKI, 2004).

De acordo com a classificação nutricional referenciada e aceita (BRASIL, 1998), as amostras de monguba e buriti possuem altos teores em Mg, contribuindo com 33,7 e 32,4% da IDR de um adulto saudável, respectivamente. Já as polpas de inajá e uxi podem ser consideradas como fontes naturais desse elemento. Logo, as amêndoas de monguba e as polpas de buriti, inajá e uxi podem contribuir com teores de Mg para atender a IDR e prevenir um quadro de carência nesta espécie mineral e, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças crônicas (JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012).

Os benefícios da presença do mineral cobre (Cu) na nutrição humana incluem a manutenção da estrutura óssea, do sistema nervoso central e a absorção do ferro (VAITSMAN; DUTRA; AFONSO, 2001). Já existem estudos que comprovam que a ingestão em quantidades insuficientes de cobre contribui para o desenvolvimento de

doenças cardiovasculares, infecções microbianas e anemias, enquanto seu excesso está relacionado à esclerose, asma, hipertensão, depressão, convulsões, necrose do fígado e problemas cardiorrespiratórios (AZEVEDO; CHASIN, 2003; GOLDHABER, 2003).

Os teores de Cu encontrados nos frutos inajá e monguba foram de 0,08 e 0,8 mg 100g⁻¹, respectivamente. O teste Tukey revelou certa semelhança entre a maioria das demais amostras para esta espécie mineral. Uma correlação positiva ($R^2 = 0,70$) foi observada entre os teores de Cu e de proteínas nos frutos estudados. A participação desse elemento na síntese de proteínas em plantas pode explicar este resultado (FAQUIN, 2005).

Avaliando-se a classificação mineral em relação a ingestão de cobre, observa-se que as polpas do abiu, bacuri, buriti e pajurá podem ser classificadas como fontes nesta espécie química, por atenderem com 22,3; 17,7; 21,3; 15,6% da IDR, respectivamente. As sementes de monguba e a polpa de uxi mostraram-se com alto teor em Cu, contribuindo com 83,0 e 35,7% da IDR, respectivamente. Neste sentido, a inserção desses frutos na dieta seria bastante interessante, já que contribuiriam para atender as recomendações diárias e ao mesmo tempo poderiam prevenir danos à saúde causados pela deficiência do mineral.

A amostra de uxi apresentou o maior teor de ferro (Fe) (1,2 mg 100g⁻¹), atendendo a 15% da IDR de um adulto saudável, quando ingeridos 100 g de sua polpa. Assim, esse fruto pode ser considerado uma fonte potencial de Fe. Esse elemento faz parte da estrutura de uma série de enzimas que participam de reações de oxirredução durante o metabolismo vegetal, e está intimamente conexo à hemoproteína e à Fe-S-proteína (MALAVOLTA, 1980). Tal fato pode explicar a correlação positiva ($R^2 = 0,61$) observada também entre os teores de Fe e de proteínas.

Em relação ao mineral manganês (Mn), maiores teores foram encontrados nas polpas de açaí, buriti e uxi. A polpa de uxi pode ser classificada como fonte natural em Mn (29% da IDR) e as polpas de açaí e buriti revelaram-se com alto teor nesse micromineral, excedendo 100% da IDR. Apesar da grande quantidade de Mn fornecida através do consumo de 100 g das polpas de açaí e buriti, observa-se que os resultados das concentrações ainda levariam a quantidades inferiores ao nível máximo de ingestão tolerável (11 mg dia⁻¹), o que é bastante interessante, do ponto de vista toxicológico. Além disso, deve-se considerar que apenas 3 a 5% do Mn ingerido é efetivamente absorvido pelo organismo e disponibilizado para as funções metabólicas normais, uma vez que uma

grande parcela desse elemento acaba sendo excretada pelas fezes via bile (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; MARTINS; LIMA, 2001). Logo, a efetiva inclusão desses frutos na dieta alimentar traria diversos benefícios, como nos processos de formação dos ossos, na função reprodutiva e no metabolismo de carboidratos e lipídeos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006), sem no entanto ocasionar qualquer intoxicação.

Os teores obtidos para o Zn nos frutos estudados variaram de 0,2 na polpa de biribá a 1,1 mg 100g⁻¹ no inajá. Apesar dos frutos não serem classificados como fontes naturais em Zn, as concentrações obtidas podem contribuir para atingir a IDR em Zn através da complementação mineral com outros alimentos.

De um modo geral, os frutos avaliados aqui, em especial abiu, açaí, bacuri, buriti, inajá, monguba, pajurá e uxi, apresentaram teores dos minerais analisados, em quantidades suficientes que podem contribuir para correções nutricionais.

A Tabela de Composição de Alimentos-TACO (TACO, 2011) apresenta dados sobre a composição dos alimentos consumidos no Brasil, tais como informações sobre a composição centesimal, mineral (Ca, Mg, Mn, P, Fe, Na, K e Zn) e vitamínica (retinol, niacina, vitamina B1 - tiamina, vitamina B2 - riboflavina, vitamina B6 - piridoxina e vitamina C). Apesar da diversidade em frutíferas, apenas seis frutos nativos da região amazônica foram contemplados (açaí, abiu, cupuaçu, macaúba, tucumã e pupunha), evidenciando a necessidade de uma base de dados sobre a composição química de frutos nativos da maior floresta tropical do mundo.

Foram encontrados, na literatura, trabalhos envolvendo a determinação de minerais em amostras de frutos amazônicos. Em alguns, o tratamento dado às amostras baseou-se em na digestão da polpa ou sementes por via úmida; em outros, empregou-se a calcinação, seguida de dissolução das cinzas em ácido. Mas na maioria dos casos, tal como no presente trabalho, a análise propriamente dita baseou-se na técnica espectrometria atômica (BERTO *et al.*, 2015a; ARAGÃO, 2013; YUYAMA *et al.*, 2013; NAOZUKA *et al.*, 2011; YUYAMA *et al.*, 2011; ECHEVERRI; ROMÁN-JITDUTJAANO, 2011; MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011; DUARTE, 2008; LETERME *et al.*, 2006; MARIN, 2006).

Berto *et al.* (2015a), por exemplo, caracterizaram diferentes porções (casca, polpa e sementes) de dez frutos nativos da Amazônia através de suas composições centesimais, conteúdo mineral (Mn, Zn, Fe, Cu, Mg e Na) e composições de ácidos graxos. As amostras foram mineralizadas conforme método preconizado pela AOAC para obtenção de cinzas (CUNNIFF, 1998) e as determinações realizadas por espectrometria de

absorção atômica por chama. A casca e a polpa apresentaram altos teores de umidade, enquanto as sementes apresentaram maiores teores de cinzas, proteína bruta e carboidrato total. Altos níveis de lipídios foram encontrados nos frutos de piquiá (polpa e amêndoa), em duas variedades das amostras de umari (casca e polpa), na polpa de uxi e na semente de biribá. Uma ampla faixa de conteúdo mineral foi detectada, sendo os maiores teores encontrados na polpa de bacuri-azedo (Mn e Zn), semente de cubiu pequena (Cu), casca externa de piquiá (Fe), casca maior do cubiu (Mg) e em todas as partes das amostras de pajurá (Na). Na análise de ácidos graxos, os autores identificaram e quantificaram um total de 32 ácidos graxos. Os maiores teores em ácido palmítico e ácido oleico foram encontrados nas cascas e polpas das duas variedades de umari e de uxi, além da polpa e amêndoa de piquiá, enquanto os maiores teores de ácido linoléico e α -linolênico foram encontrados na semente de biribá e polpa de uxi, respectivamente. Os resultados contribuíram para a composição da tabela de alimentos brasileira e auxiliaram na segurança alimentar.

Yuyama *et al.* (2013) avaliaram as características físico-químicas e os teores de elementos minerais (Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Fe e Cu) nas polpas dos frutos abiu, bacuri, carambola, ingá-cipó e mapati, todos provenientes da região amazônica. As amostras liofilizadas foram submetidas a um tratamento de digestão úmida e as determinações realizadas em um espectrômetro de absorção atômica. A polpa de abiu (massa seca), apresentou a maior concentração em Fe; bacuri, um maior teor em Mg; carambola, em Zn; ingá-cipó, em K, Ca e Mn, e mapati, em Na. No entanto, elevados valores de desvio padrão indicaram uma grande heterogeneidade das amostras e uma incerteza associada à estimativa da média.

Leterme *et al.* (2006) avaliaram o conteúdo elementar (Ca, P, Mg, K, Na, Zn, Cr, Fe, Mn, Ni, Cu, Se e Co) em 101 amostras de alimentos (frutos tropicais, folhas e tubérculos), inclusive o fruto da monguba, produzidos nas regiões de florestas úmidas e Andes da Colômbia. Tendo em vista os diferentes analitos e a variada composição dos alimentos, as amostras foram submetidas a dois tratamentos diferentes: calcinação a 450°C durante 6 h (para análise dos elementos P, Ca, Mg, K, Na, Zn, Cr) e digestão úmida utilizando a mistura ácida HCl:HNO₃ (1:3) sob aquecimento em refluxo por 2h (para análise de Fe, Mn, Ni, Cu, Co e Se). A eficiência das determinações foi validada mediante material de referência certificado de folhas. Os resultados mostraram que as amostras de semente de monguba possuíam alto teor em Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, sendo ainda fonte em

Ca. Além disso, os teores de níquel (Ni) apresentaram-se abaixo do LOQ. Até a conclusão da presente pesquisa, nenhum outro trabalho que tenha realizado a caracterização mineral das sementes de monguba foi encontrado na literatura.

Realizar uma comparação entre a composição mineral dos frutos, encontrada aqui, com os dados da literatura, pode ser uma tarefa bastante árdua e complexa, além de não recomendável, pois deve-se levar em conta alguns fatores intrinsecamente relacionados, tais como fatores genéticos (gênero, espécie e variedade) e ambientais, como solo, clima, estágio de maturidade da planta e frutos, períodos de coleta (durante a florada, em estágio de frutificação, sob *stress* hídrico, etc). Deve-se considerar também a técnica analítica empregada e os procedimentos de pré-tratamento das amostras antes da sua análise, em geral espectrométrica (SILVA; SANTOS; PAIVA, 1998; HARDISSON *et al.*, 2001).

Mesmo assim, as faixas dos teores obtidos para as amostras estudadas foram confrontados com alguns dados da literatura, e a seguir citam-se alguns trabalhos já publicados, nos quais os teores dos minerais, em determinadas matrizes, mostraram certa concordância com os dados apresentados na presente pesquisa: Mn em amostras de abiu (TACO, 2011); Ca, Na e Fe em amostras de açaí (TACO, 2011; YUYAMA *et al.*, 2011); Na, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de bacuri (BERTO *et al.*, 2015a; YUYAMA *et al.*, 2013); Ca, Mg e Mn em amostras de biribá (BERTO *et al.*, 2015a; LETERME *et al.*, 2006); Fe em amostras de buriti (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011; MARIN, 2006); Fe e Zn em amostras de cupuaçu (TACO, 2011; NAOZUKA *et al.*, 2011); Mg em amostras de inajá (DUARTE, 2008), e Mg em amostras de uxi (BERTO *et al.*, 2015a; ARAGÃO, 2013).

Podem ser citados ainda trabalhos nos quais os teores dos minerais, em determinadas matrizes, estão abaixo dos encontrados na presente pesquisa: Ca, Na Mg, Cu, Fe e Zn em amostras de abiu (TACO, 2011; YUYAMA *et al.*, 2013); Mn e Zn em amostras de açaí (TACO, 2011; YUYAMA *et al.*, 2011); Ca em amostras de bacuri (BERTO *et al.*, 2015a; YUYAMA *et al.*, 2013); Ca, Mg, Cu e Mn em amostras de cupuaçu (TACO, 2011; NAOZUKA *et al.*, 2011), e Zn em amostras de inajá e pajurá (ECHEVERRI; ROMÁN-JITDUTJAANO, 2011; DUARTE, 2008; BERTO *et al.*, 2015a). Por outro lado, os teores dos minerais e frutos a seguir, encontrados neste trabalho, estiveram abaixo dos relatados por estes autores: Mg e Cu em amostras de açaí; Na, Cu, Fe e Zn em amostras de biribá; Na em amostras de buriti e cupuaçu; Ca, Na e Fe

em amostras de inajá; Ca, Na, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, em amostras de monguba; Na, Mg, Cu, Fe e Mn em amostras de pajurá, e Ca, Na, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de uxi.

Não foram encontradas referências na literatura relacionadas aos teores de Cu e Mn em polpas de inajá, nem de Ca em polpas de pajurá.

6.1.3 Capacidade antioxidante dos frutos amazônicos

Devido à diversidade química dos antioxidantes e seu comportamento, que pode responder de maneira diferente a numerosas fontes oxidantes, ainda não há um método único, simples e universal para a avaliação da capacidade antioxidante, razão pela qual torna-se necessário avaliar-se a capacidade antioxidante por diferentes métodos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). No presente trabalho, três métodos (DPPH, ABTS e NBT) foram escolhidos para tal fim, com base em seus diferentes mecanismos de reação e fontes oxidantes. Na etapa de extração dos antioxidantes das amostras, os seguintes sistemas extratores foram testados: etanol puro, solução tampão aquosa (K-PBS 50 mmol L⁻¹ contendo EDTA 0,1 mmol L⁻¹ pH=7,5 ou PBS 10 mmol L⁻¹ pH= 7,4) e solução hidroetanólica (1:1). Esse estudo inicial foi importante, considerando-se os aspectos como segurança no manejo, o consumo humano de etanol em produtos alimentícios como bebidas, vinhos e licores, e a referência prévia destes como extratores de antioxidantes (SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007).

Os resultados da capacidade antioxidante, expressa em IC₅₀ (mg mL⁻¹, massa seca), para os extratos dos frutos, empregando-se os diferentes métodos analíticos, são apresentados na Tabela 11.

Observa-se que todas as amostras exibiram qualidades antioxidantes relevantes, e que poucos miligramas dos extratos foram suficientes para inibir 50% da atividade das fontes oxidantes. Foi possível verificar ainda que a capacidade antioxidante dependeu do solvente empregado. Menores valores de IC₅₀, que correspondem a uma maior capacidade antioxidante, foram obtidos nos extratos etanólicos das amostras de biribá e bacuri contra os radicais DPPH[•] (< 7,0 mg mL⁻¹) e ABTS^{•+} (< 0,6 mg mL⁻¹).

Tabela 11 - Capacidade antioxidante (IC₅₀) dos diferentes extratos dos frutos amazônicos

Frutos	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)				
	DPPH	ABTS		NBT	
	etOH	etOH	PBS	PBS:etOH	K-PBS
Abiu	9,8 (6,2) ^{a,b}	2,3 (2,2) ^a	0,3 (3,2) ^a	0,2 (6,3) ^{a,b}	0,4 (16,3) ^a
Açaí	9,8 (0,6) ^{a,b}	0,8 (3,7) ^b	0,9 (1,1) ^b	0,6 (1,67)	0,5 (2,0) ^a
Bacuri	7,0 (3,6) ^a	0,4 (16,7) ^c	0,6 (1,6)	0,4 (2,5) ^c	6,8 (4,9) ^b
Biribá	5,4 (1,3) ^a	0,6 (1,7) ^{b,c}	1,7 (7,0) ^c	0,5 (3,9)	7,6 (2,6) ^b
Buriti	79,7 (8,7)	13,4 (1,6)	1,5 (1,34)	0,9 (1,1)	7,3 (2,6) ^b
Cupuaçu	27,6 (0,4) ^c	9,2 (1,9)	0,8 (1,2) ^b	0,8 (3,9) ^d	5,3 (5,5)
Inajá	13,5 (4,9) ^{a,b}	2,4 (4,5) ^a	0,4 (7,5) ^a	0,4 (7,9) ^c	0,5 (3,8) ^a
Monguba	20,7 (3,0) ^c	5,0 (2,0)	0,4 (2,9) ^a	0,1 (9,1) ^a	0,4 (2,9) ^a
Pajurá	10,6 (3,9) ^{a,b}	2,0 (2,0)	1,7 (1,8) ^c	0,2 (5,9) ^b	6,7 (3,9) ^b
Uxi	106,1 (11,7)	3,7 (0,3)	1,2 (10,4)	0,8 (3,7) ^d	16,1 (7,7)

Resultados obtidos em base seca. etOH = extratos etanólicos; PBS = extratos em solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH = 7,4); PBS:etOH = extratos hidroetanólicos (1:1); K-PBS= extratos em solução tampão de fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo EDTA (0,1 mmol L⁻¹). Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação, CVs (%): precisão das medidas. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Em geral, para os extratos etanólicos, os valores de IC₅₀ obtidos pelo método DPPH foram maiores, quando comparados aos encontrados pelo método ABTS, o que mostra a necessidade de maiores quantidades de amostras para inibir os radicais DPPH[•]. Isso ocorreu em função de diversos fatores, tais como: maior estabilidade do radical DPPH (efeito de ressonância causado pela presença dos anéis aromáticos em sua estrutura química com consequente distribuição da carga eletrônica por toda molécula) (SHALABY; SHANAB, 2013; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005); presença de compostos que possuem capacidade de eliminação de radicais ABTS^{•+}, o que nem sempre ocorre contra o radical DPPH[•] (WANG *et al.*, 2008); período de incubação para se atingir um estado estacionário; concentração dos radicais empregada no método, entre outros (CERRETANI; BENDINI, 2010).

Os extratos aquosos de abiu, açaí, inajá e monguba resultaram numa maior capacidade antioxidante contra os radicais O₂^{•-} pelo método NBT (IC₅₀ não excedendo 0,5 mg mL⁻¹). Os extratos aquosos de abiu, inajá e monguba foram melhores inibidores dos radicais ABTS^{•+} (IC₅₀ <0,4 mg mL⁻¹), o que revelou, nessas amostras, maiores quantidades em antioxidantes hidrofílicos.

Do ponto de vista biológico, o ensaio NBT representa uma ferramenta mais concisa, pois permite aos investigadores avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra contra um radical livre específico, biologicamente relevante. O radical $O_2^{\bullet-}$ é uma ERO produzida em sistemas biológicos e em alimentos, e comporta-se como a maioria das espécies radicais que são extremamente reativas e citotóxicas, estando relacionado a vários distúrbios, como a doença de Parkinson e o câncer (KHODADE *et al.*, 2014; VANELLA *et al.*, 1993; KONTOS; WEI, 1986; BIRNBOIM, 1986). De acordo com os resultados obtidos por esse método, os frutos amazônicos abiu, açaí, inajá e monguba podem ser considerados alimentos com alto potencial antioxidante, promissores para aplicações na indústria farmacêutica e na medicina, tendo em vista oferecerem as maiores inibições do radical $O_2^{\bullet-}$.

Os extratos hidroetanólicos das amostras de abiu, monguba e pajurá apresentaram a maior capacidade antioxidante entre todos os extratos e ensaios ($IC_{50} < 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$). Considerando os resultados do método ABTS para as mesmas amostras nas diferentes polaridades de extratos, o uso da solução hidroetanólica (1:1) proporcionou melhores extrações dos compostos antioxidantes que os sistemas monossolventes (solução tampão ou etanol puro). Devido à heterogeneidade em estrutura química e, conseqüentemente, em polaridade dos compostos antioxidantes, solventes binários têm sido reportados na literatura como melhores extratores de antioxidantes (WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2007).

Dependendo do fruto analisado e da região amostrada, a capacidade antioxidante encontrada pode ser muito diferente daquela registrada na literatura. Isso porque a análise envolve matrizes cultivadas sob diferentes condições (clima, composição do solo e da água) e variedades taxonômicas (espécies, variedades e cultivares), havendo ainda diferenças nos procedimentos de preparação da amostra, extração dos compostos antioxidantes (solvente, temperatura, tempo e procedimento físico), concentrações das soluções de fontes oxidantes, razão entre volumes de amostra/reagente, duração da reação, comprimento de onda da medição de absorbância, soluções padrão de antioxidantes (geralmente ácido gálico, trolox e ácido ascórbico) e forma de expressar os resultados (geralmente em porcentagem de inibição do radical para uma dada concentração da amostra, massa equivalente de um antioxidante de referência por massa da amostra ou extrato, ou IC_{50}) (ROCHA *et al.*, 2013). Neste sentido, a padronização de métodos visando à determinação da capacidade antioxidante têm sido motivo de

discussão em trabalhos científicos que buscam unificar quantidades e unidades, bem como admitir comparações (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; APAK *et al.*, 2013).

Mesmo diante da complexidade em realizar comparações, a capacidade antioxidante obtida para os frutos contemplados neste estudo foi confrontada com alguns dados da literatura (NEVES *et al.*, 2012; CANUTO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010).

Neves *et al.* (2012) avaliaram a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) e o conteúdo em compostos fenólicos pelo método Folin em 8 espécies de frutos liofilizados (casca e polpa) nativos da Amazônia, entre estes açaí, inajá e uxi. Metanol foi empregado como solvente, trolox como antioxidante de referência e os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de trolox por 100 g de amostra. Informações sobre a técnica de extração não foram apresentadas. Os resultados mostraram que, entre as polpas dos frutos aqui estudadas, a amostra de açaí revelou a maior capacidade antioxidante contra o radical DPPH $^{\bullet}$, seguido da amostra de uxi e inajá. Embora haja diferença entre os parâmetros tempo de reação (25 min) e comprimento de onda (517 nm) utilizados pelos autores e os empregados neste estudo, testes preliminares realizados neste estudo mostraram não haver diferenças estatísticas entre os resultados quando empregados os tempos de reação de 20 e 25 min nas amostras, o que revela que para estas amostras, foi atingido um platô no tempo de reação de 20 min. Além disso, em geral têm sido empregados períodos de incubação de 20 ou 30 min para se atingir o ponto final da reação de neutralização do radical DPPH $^{\bullet}$ (MARINOVA; BATCHVAROV, 2011). Da mesma forma, neste estudo foram realizados testes prévios em dois diferentes comprimentos de onda (490 e 560 nm), e os resultados não mostraram diferenças significativas, confirmando o alcance da banda efetiva de absorção da solução etanólica de DPPH. Marinova e Batchvarov (2011) listaram uma ampla variedade de publicações científicas que empregaram o método DPPH em comprimentos de onda na faixa de 492 e 540, e, também mostraram que a precisão do método é dependente, especialmente, do solvente utilizado e da proporção volume/reagente DPPH.

Canuto *et al.* (2010) determinaram, em 15 amostras de polpas de frutos amazônicos, as características físico-químicas, os teores de compostos bioativos (ácido ascórbico e compostos fenólicos) e a capacidade antioxidante pelo método ABTS, após extração em sistema de ultrassom. Os autores testaram diferentes solventes extratores, e a mistura metanol:água, 8:2 v/v forneceu melhores resultados. Outras condições

operacionais encontradas como sendo as melhores, pelos autores, foram: diluição do radical ABTS^{•+} com solução tampão PBS (pH = 7,4); curva analítica construída com solução etanólica do radical sintético trolox, e uso da água como branco controle. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de equivalentes de trolox, tendo os autores proposto a seguinte sequência decrescente da capacidade antioxidante dos frutos: açai > buriti > abiu = bacuri = cupuaçu.

O presente estudo forneceu novos dados sobre a capacidade antioxidante de frutos amazônicos empregando a adaptação de métodos espectrofotométricos às microplacas e aos leitores de placas espectrofotométricas. Essa estratégia mostra ser hoje uma tendência e traz diversas vantagens analíticas tais como redução da quantidade de amostras e reagentes, maior facilidade, rapidez e análise simultânea de dezenas de amostras (SIGUEMOTO; GUT, 2017).

Em geral, todos os frutos amazônicos contemplados no presente estudo e seus respectivos extratos, em diferentes polaridades, apresentaram capacidade antioxidante contra todos os radicais avaliados, sejam eles sintéticos ou biológicos. Assim, os frutos possuem propriedades antirradicais potenciais a serem exploradas em muitos setores industriais, como nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e cosméticas.

Vale mencionar que se deve aqui dar destaque especial ao equilíbrio fornecido à biota que rotineiramente se alimenta desses frutos, incluindo o homem que habita as regiões amazônica e pré-amazônica, indígenas, quilombolas, ribeirinhos, etc. Ao longo dos anos, essas comunidades têm sido beneficiadas sobremaneira com a presença dessas espécies vegetais, mediante sua inserção na dieta humana e dos animais. A presença dessas espécies vegetais nesses ecossistemas tem contribuído sobremaneira com a sobrevivência de diversas espécies, bem como com o equilíbrio natural ao longo das diferentes cadeias tróficas que compõem esses biomas.

6.1.4 Viabilidade celular anticâncer apresentada pelos frutos

Existe na atualidade uma busca crescente por novas fontes naturais com efeitos citotóxicos e antioxidantes pela indústria médica moderna. A relação entre o consumo de frutas e hortaliças e a diminuição do risco associado a alguns distúrbios da saúde, como por exemplo o câncer de cólon tem sido evidenciado (GALLAHER; TRUDO, 2013). Devido a essa tendência, nessa etapa do trabalho foram avaliados os efeitos na

proliferação celular de extratos dos dez frutos amazônicos selecionados, contra linhas celulares de câncer do cólon humano (caco-2).

Seis diferentes diluições de extratos dos frutos (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram testadas e, como resultados, tem-se os efeitos antiproliferativos, *in vitro*, dessas diferentes concentrações de extratos dos frutos sobre a linhagem celular de caco-2, após exposição por 72 h (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados da viabilidade celular anticâncer promovida pelos extratos dos frutos amazônicos

Frutos	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Abiu	ND
Açaí	272,3 (11,8) ^{a,b}
Bacuri	393,8 (10,5) ^d
Biribá	233,1 (8,9) ^{b,c}
Buriti	349,1 (10) ^{a,d}
Cupuaçu	ND
Inajá	229,9 (6,0) ^c
Monguba	62,5 < IC ₅₀ < 250,0*
Pajurá	67,6 (8,3)
Uxi	353,3 (9,0) ^{a,d}

Resultados obtidos em base seca. Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação, CVs (%): precisão das medidas. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. ND = a inibição não excedeu 50% nas concentrações testadas. *Variação no efeito antiproliferativo entre repetições ao longo do tempo. Resultados de menor IC₅₀ refletem maior proteção antitumoral.

Os resultados mostraram que as concentrações crescentes dos extratos dos frutos amazônicos levaram a uma inibição no crescimento da linhagem celular testada. Os frutos de biribá, inajá, monguba e pajurá apresentaram menores valores de IC₅₀ (não excedendo 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), indicando maior capacidade de induzir a morte das células tumorais de caco-2. Esse comportamento foi confirmado pela repetição do experimento, em diferentes meses, para as mesmas amostras dos frutos de biribá, inajá e monguba em triplicata, com quatro replicatas internas.

Uma variabilidade interna entre os resultados obtidos para a amostra de monguba foi observada, e isso pode ter sido causado por um aumento da citotoxicidade ao longo

do tempo, no decorrer das repetições do ensaio em meses diferentes. Uma possível explicação para esse comportamento seria a oxidação de compostos específicos, antes inibidores da morte celular, presentes na composição do fruto. Desse modo, para a amostra de monguba os resultados foram expressos como uma faixa de concentração que possibilitou, em todas as análises, uma supressão do crescimento celular significativa (IC_{50} inferior a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Por outro lado, extratos dos frutos de abiu e cupuaçu causaram uma pequena redução proliferativa, mesmo na maior concentração utilizada ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que impediu de estimar o valor da concentração destas amostras responsáveis pela morte de 50% das células tumorais (IC_{50}).

Em um trabalho relativamente recente, Jiménez *et al.* (2016) estudaram os efeitos antiproliferativos e antioxidantes *in vitro* de diferentes frações da planta rosa-canina (uma flor também conhecida como rosa-mosqueta) em linhagens humanas de câncer de cólon (Caco-2). O extrato total da amostra foi obtido pela homogeneização da casca e polpa, seguido de maceração por 24 h em acetona:água (80:20 v/v) e liofilização. As células tumorais de caco-2 na densidade de 4×10^3 células por poço foram expostas por 72 h ao extrato diluído na solução meio de cultura e a viabilidade celular foi avaliada através do método SRB. Os extratos apresentaram citotoxicidade em todas as concentrações. Observando os resultados expressos como porcentagem do controle para as diferentes concentrações de rosa-canina, os autores puderam inferir para as linhagem celulares de caco-2 PD7 e TC7, valores de IC_{50} na faixa de 250-500 e 125-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Um estudo mais recente desenvolvido por Shalom e Cock (2018) demonstrou o potencial antioxidante de frutos e folhas de *Terminalia ferdinandiana*, uma árvore australiana que produz uma fruta conhecida comumente como ameixa de Kakadu, sendo que esta possui o maior teor de vitamina C do mundo. Os autores prepararam extratos em acetato de etila, metanol e água e os aplicaram para inibir a proliferação de algumas células cancerosas, incluindo a linhagem celular de caco-2 (densidade de 5×10^3 células por poço). Para a dosagem, empregaram o teste colorimétrico de proliferação celular MTS. Os resultados em IC_{50} dos extratos aquosos foram superiores a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os frutos e suas folhas (1520 e $1230 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

As atividades antiproliferativas de um rol de extratos preparados a partir de seis frutos australianos contra células caco-2 foram determinadas por Sirdarta *et al.* (2016),

utilizando um ensaio multicelular de proliferação celular baseado em esferoides tumorais. No entanto, entre os extratos aquosos, apenas o fruto de limão apresentou atividade antiproliferativa capaz de calcular os valores de IC₅₀ (885 µg mL⁻¹), enquanto a inibição dos outros frutos não excedeu uma porcentagem de 50%, em nenhuma das concentrações avaliadas.

Uma comparação entre os resultados obtidos nesses estudos não seria viável, em virtude das diferenças entre as densidades celulares dos extratos, entre os métodos colorimétricos escolhidos, e entre os procedimentos de extração empregados. Contudo, se todas as condições do método forem otimizadas, torna-se possível comparar diferentes plantas e seus diferentes extratos.

Até a atualidade, não foram encontrados, na literatura, trabalhos mostrando os efeitos antiproliferativos dos frutos amazônicos contemplados neste estudo contra a linhagem celular de caco-2. O teste de viabilidade celular constitui uma triagem que estima a presença de moléculas com efeitos antiproliferativos e citotóxicos. Neste sentido, pelos dados constantes na Tabela 12, observa-se que a maioria dos frutos amazônicos possuem compostos fitoquímicos capazes de afetar a viabilidade celular pela supressão do crescimento celular. O mecanismo de atividade antiproliferativa dos frutos estudados contra células cancerígenas não é claro; no entanto, alguns estudos mostraram que diferentes compostos antioxidantes podem ter efeitos citotóxicos em cânceres (JAIN *et al.*, 2013; SHARONI; DANILENKO; LEVY, 2000; NOVI, 1981; SINDHI *et al.*, 2013).

Considerando que em frutos e hortaliças os compostos fenólicos são geralmente os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes (HERVERT-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011) e por atividades anticancerígenas em diferentes órgãos (JIMÉNEZ *et al.*, 2016), possivelmente os resultados dos efeitos antiproliferativos observados neste estudo e a capacidade antioxidante demonstrada anteriormente podem estar relacionados à presença de compostos fenólicos.

O câncer é caracterizado pela proliferação celular descontrolada, e é provável que o mecanismo antiproliferativo desses extratos possa envolver a indução de apoptose da linhagem celular de caco-2. Nessa visão, é importante dar continuidade à avaliação dos tipos de morte celulares aos quais as células de caco-2 são induzidas pelos extratos dos frutos estudados, a fim de confirmar a capacidade em induzir a morte celular por apoptose. O progresso dessa pesquisa pode direcionar a estratégias terapêuticas para o consumo de alimentos funcionais.

6.1.5 Presença de compostos bioativos nos frutos

6.1.5.1 Vitamina C

A capacidade redutora da vitamina C em diversas reações bioquímicas caracteriza sua função biológica. Entre outras fontes oxidantes, a vitamina C é capaz de reduzir as EROs. Sua principal função é como cofator de numerosas reações que requerem Cu e Fe reduzidos como antioxidantes hidrossolúveis que atuam intra e extracelulares (VANNUCCHI; ROCHA, 2012).

As concentrações de vitamina C obtidas nos frutos estudados são apresentadas na Tabela 13, bem como sua classificação em função da IDR, estabelecida pelo governo brasileiro (BRASIL, 1998).

Tabela 13 - Teores de vitamina C encontradas nos frutos amazônicos analisados

Frutos	Vitamina C (mg 100 g ⁻¹)	% IDR atendido*	Classificação**
Abiu	5,3 (8,2) ^a	11,9	-
Açaí	80,0 (8,8)	177,6	Alto teor
Bacuri	28,3 (11,4) ^{b,c}	62,9	Alto teor
Biribá	10,0 (1,3) ^a	22,2	Fonte
Buriti	21,9 (7,5) ^{c,d}	48,6	Alto teor
Cupuaçu	52,6 (0,6)	116,8	Alto teor
Inajá	37,7 (3,7) ^b	83,7	Alto teor
Monguba	5,2 (3,1) ^a	11,5	-
Pajurá	7,7 (8,9) ^a	17,1	Fonte
Uxi	15,0 (13,5) ^{a,d}	33,4	Alto teor

Resultados obtidos em base úmida. Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação, CVs (%): precisão das medidas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. * BRASIL, 2005. ** BRASIL, 1998.

Os teores de vitamina C nos frutos *in natura* estiveram na faixa de 5,2 a 80,0 mg 100 g⁻¹ para a amêndoa de monguba e a polpa de açaí, respectivamente. No Brasil, foi estabelecida uma IDR de 45 mg de vitamina C, para um adulto saudável (BRASIL, 2005),

enquanto que o *Institute of Medicine* (2006) lista os valores da IDR por grupo de estágio de vida, sendo 90 mg para um homem adulto saudável e 75 mg para uma mulher adulta.

A definição proposta no Brasil permite qualificar as polpas de biribá e pajurá como fontes de vitamina C (teores de 15 a 29% da IDR) e os frutos de açaí, bacuri, buriti, cupuaçu, inajá e uxi como alimentos de alto teor nesse nutriente (teor > 30% da IDR) (BRASIL, 1998).

Apesar da ingestão de 100 g das polpas de açaí e cupuaçu contribuírem em mais de 100% da IDR, o nível de ingestão superior tolerável, que estaria relacionado a efeitos adversos, tais como diarreia osmótica e distúrbios gastrointestinais, é de 2000 mg, e nunca será atingido, se considerarmos tal ingestão.

Comparando-se os resultados obtidos com os dados da literatura, observa-se que os teores de vitamina C estão dentro da faixa reportada para a polpa de abiu (BRASIL, 2015; CANUTO *et al.*, 2010), açaí (RUFINO *et al.*, 2010), bacuri (BRASIL, 2015), buriti (GONÇALVES, 2008), cupuaçu (BRASIL, 2015; GONÇALVES, 2008) e uxi (GONÇALVES, 2008; MARX, 2002), enquanto que os teores obtidos neste estudo para a polpa de biribá são superiores aos reportados por Villachica (1996).

Não foram encontrados registros da concentração de vitamina C para os frutos inajá, monguba e pajurá e, portanto, este trabalho é o primeiro a apresentar dados sobre a presença desse nutriente em tais frutos. A importância de novas fontes de vitamina C para inserção na dieta alimentar é de grande interesse para a área da ciência e tecnologia de alimentos, bem como para a área da saúde, visto que é um componente essencial para as funções fisiológicas do corpo humano.

6.1.5.2 Compostos fenólicos

O conhecimento do teor de compostos fenólicos em frutos é importante por refletir o mecanismo de adaptação e resistência da planta ao ambiente, a influência no sabor e nas características tecnológicas do alimento, assim como no seu potencial nutritivo e funcional (ROCHA *et al.*, 2013).

No presente estudo, o método Folin-Ciocalteu foi empregado para medir a redução deste reagente pelos compostos fenólicos presentes nos frutos amazônicos através da formação de um complexo azul que foi monitorado espectrofotometricamente a 750 nm, empregando ácido gálico como composto fenólico de referência. As concentrações dos

compostos fenólicos totais nos frutos amazônicos, em massa seca, são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Teores de compostos fenólicos totais dos frutos amazônicos, obtidos nos diferentes extratos

Frutos	Compostos Fenólicos (mg EAG 100 g ⁻¹)		
	<i>Extratos dos Frutos</i>		
	etOH	etOH:K-PBS	K-PBS
Abiu	134,4 (6,8) ^a	779,0 (7,3) ^a	333,5 (5,2) ^a
Açaí	95,7 (8,0) ^b	353,2 (7,0) ^{b,c}	214,8 (3,5) ^b
Bacuri	331,5 (1,4)	531,8 (3,1) ^d	328,3 (7,6) ^a
Biribá	62,1 (4,1) ^c	427,0 (7,2) ^{b,e}	139,3 (9,5) ^{c,d}
Buriti	28,1 (3,9) ^d	188,6 (4,2) ^f	170,4 (4,3) ^d
Cupuaçu	111,3 (4,6) ^{b,e}	302,9 (7,3) ^c	241,9 (1,5) ^b
Inajá	121,7 (3,5) ^{a,e}	476,9 (3,8) ^{d,e}	351,7 (2,0) ^a
Monguba	105,0 (10,0) ^b	751,1 (1,75) ^a	324,1 (4,1) ^a
Pajurá	69,9 (2,5) ^c	800,6 (3,0) ^a	140,0 (0,1) ^{c,d}
Uxi	44,1 (6,7) ^d	157,8 (4,0) ^f	107,5 (0,4) ^c

Resultados obtidos em base seca. etOH = extratos etanólicos. K-PBS:etOH = extratos hidroetanólicos (1:1). K-PBS= extratos em solução tampão K-PBS-EDTA (pH 7,5). Entre parênteses, têm-se os coeficientes de variação, CVs (%): precisão das medidas. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Como era esperado, em todas as amostras a eficiência da extração dos compostos fenólicos foi dependente do tipo de solvente utilizado e da sua polaridade. De fato, os extratos fenólicos brutos contêm misturas complexas de algumas classes de fenóis, e estes por sua vez são seletivamente solúveis nos diferentes solventes. Nesse sentido, a polaridade do solvente desempenha um papel fundamental no aumento da solubilidade do fenol (NACZK; SHAHIDI, 2006). Misturas de solvente orgânico-água têm sido relatadas como mais eficientes na extração de compostos fenólicos do que seus respectivos solventes orgânicos puros (BOEING *et al.*, 2014).

Com base nos resultados da Tabela 14, em todas as amostras a extração binária hidroetanólica (1:1) permitiu obter a maior concentração de compostos fenólicos, seguida pela extração aquosa em solução tampão K-PBS e por último em etanol puro. Provavelmente, o extrato hidroetanólico permitiu uma melhor solvatação dos compostos

fenólicos presentes nos frutos, como resultado das interações das ligações de hidrogênio entre os sítios polares das moléculas antioxidantes e dos solventes etanol/água. O etanol foi menos eficiente na extração de compostos fenólicos, provavelmente devido à presença do radical etila que é mais longo, resultando em menor solvatação das moléculas antioxidantes (BOEING *et al.*, 2014).

Em relação ao teor de compostos fenólicos nos frutos estudados, os extratos etanólicos de bacuri exibiram importante conteúdo fenólico. Abiu, monguba e pajurá apresentaram maior concentração em compostos fenólicos quando comparados os extratos hidroetanólicos. Por sua vez, abiu, bacuri, inajá e monguba apresentaram as maiores concentrações em compostos fenólicos hidrofílicos (extração aquosa em solução tampão K-PBS). Os diferentes extratos das amostras de buriti e uxi apresentaram os menores teores em compostos fenólicos.

Seguindo o exemplo de Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008) e outros trabalhos científicos (RUFINO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012), que classificaram suas amostras em grupos por proximidade de conteúdo fenólico, os resultados obtidos aqui permitem-nos classificar os frutos em três categorias: frutos com baixo conteúdo fenólico (<100 mg EAG 100g^{-1}), com teor moderado ($100\text{--}400$ mg EAG 100g^{-1}) e com alto teor (> 400 mg EAG 100g^{-1}).

Os frutos com alto teor em compostos fenólicos na extração hidroalcóolica foram abiu, bacuri, biribá, inajá, monguba e pajurá. Fontes naturais de compostos fenólicos podem apresentar potenciais propriedades biológicas, tais como as atividades anti-ateroscleróticas, anti-inflamatórias, antitumorais, antitrombóticas, anti-osteoporose e antivirais (NIJVELDT *et al.*, 2001).

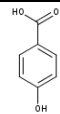
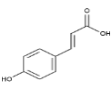
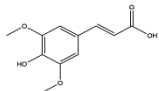
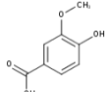
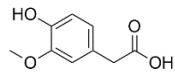
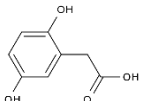
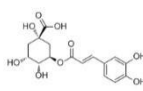
Apesar dos diferentes métodos de extração e solventes utilizados, bem como das condições ambientais que refletem na composição fenólica dos frutos, foram realizadas comparações dos resultados obtidos com alguns registrados na literatura.

Estudos recentes relatam concentrações em compostos fenólicos nos frutos de abiu provenientes do estado de Rondônia ($172,3$ mg EAG 100g^{-1} , em massa úmida, após extração com acetona 70%) (VIRGOLIN *et al.*, 2017) e de Roraima ($900,2$ mg EAG 100g^{-1} , em massa seca, após extração metanólica a 80% (v/v) acidificada com 0,5% de ácido clorídrico) (MONTERO *et al.*, 2018) próximos aos obtidos neste trabalho para a extração hidroetanólica ($220,2$ mg EAG 100g^{-1} em massa úmida ou $779,0$ mg EAG 100g^{-1} em massa seca).

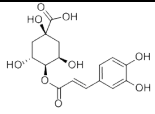
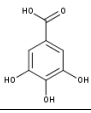
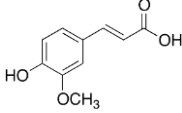
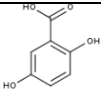
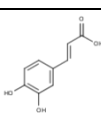
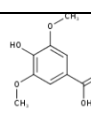
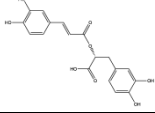
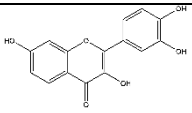
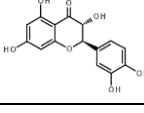
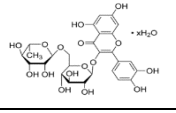
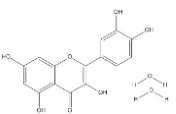
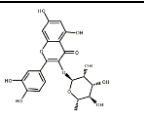
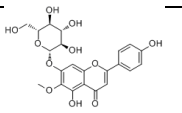
Em outro estudo envolvendo frutos de palmeiras tradicionalmente consumidos no Amapá, os resultados após etapas de extração envolvendo diferentes solventes (acetona, metanol e água) foram maiores para o buriti e menores para inajá (118,0 e 45,0 mg EAG 100g⁻¹, em massa úmida, respectivamente) (SANTOS *et al.*, 2015) que os resultados obtidos neste estudo (83,2 e 155,0 mg EAG 100g⁻¹ em massa úmida, respectivamente).

Mediante avaliação pormenorizada da composição dessas substâncias fenólicas presentes nos frutos, foi possível identificar vários grupos de substâncias que contribuíram com a atividade antioxidante destes. O Quadro 3 apresenta algumas informações importantes acerca das substâncias que foram monitoradas por ocasião das análises qualitativas. Observa-se uma variabilidade de estruturas básicas e grupos funcionais, mas percebe-se, no entanto, a presença de grupos cromóforos em todas elas, o que justifica o fato da maioria dessas substâncias possuírem forte coloração.

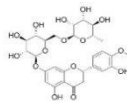
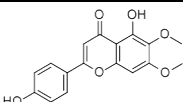
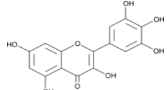
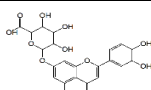
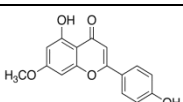
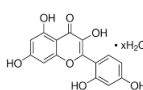
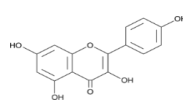
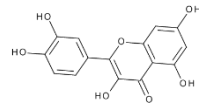
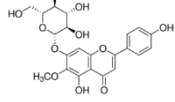
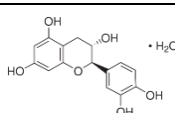
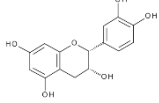
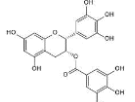
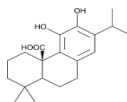
Quadro 3 - Estruturas química e classificação dos compostos fenólicos monitorados

Composto	Fórmula	Número CAS	Estrutura
Ácidos fenólicos			
Ácido 4-hidroxibenzóico	C ₇ H ₆ O ₃	99-96-7	
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	501-98-4	
Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	530-59-6	
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	121-34-6	
Ácido homovanílico	C ₉ H ₁₀ O ₄	306-08-1	
Ácido homogentísico	C ₈ H ₈ O ₄	451-13-8	
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	327-97-9	

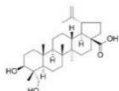
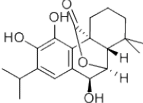
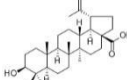
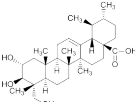
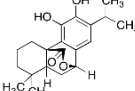
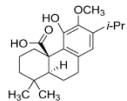
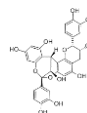
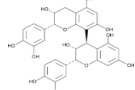
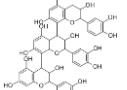
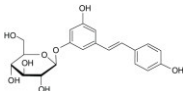
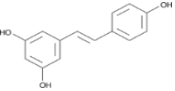
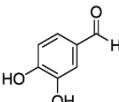
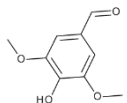
Continuação Quadro 3 ...

Ácido criptoclorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	905-99-7	
Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	149-91-7	
Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	537-98-4	
Ácido gentísico	$C_7H_6O_4$	490-79-9	
Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	331-39-5	
Ácido siríngico	$C_9H_{10}O_5$	530-57-4	
Ácido rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$	20283-92-5	
Flavonas			
Fisetina	$C_{15}H_{10}O_6$	528-48-3	
Taxifolina	$C_{15}H_{12}O_7$	480-18-2	
Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	207671-50-9	
Quercetina	$C_{15}H_{14}O_9$	6151-25-3	
Quercitrina	$C_{21}H_{20}O_{11}$	522-12-3	
Nepetina-7-glicosídeo	$C_{22}H_{22}O_{12}$	569-90-4	

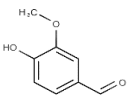
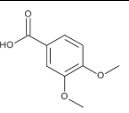
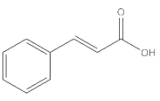
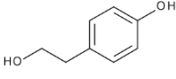
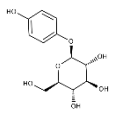
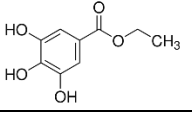
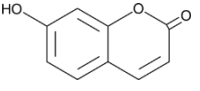
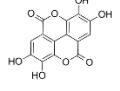
Continuação Quadro 3 ...

Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$	520-26-3	
Cirsimaritina	$C_{17}H_{14}O_6$	6601-62-3	
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	529-44-2	
Luteolina-7-O-B-d-glucuronido	$C_{21}H_{18}O_{12}$	38934-20-2	
Genkwanin	$C_{16}H_{12}O_5$	437-64-9	
Morin	$C_{15}H_{10}O_7$	654055-01-3	
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	520-18-3	
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	117-39-5	
Homoplantaginina	$C_{22}H_{22}O_{11}$	17680-84-1	
Flavanols			
(+) – Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	7295-85-4	
(-) – Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	490-46-0	
(-)-Galato de epigallocatequina	$C_{22}H_{18}O_{11}$	989-51-5	
Terpenos fenólicos			
Ácido Carnósico	$C_{20}H_{28}O_4$	3650-09-07	

Continuação Quadro 3 ...

Anemosapogenina	$C_{30}H_{48}O_4$	85999-40-2	
Rosmanol	$C_{20}H_{26}O_5$	80225-53-2	
Ácido betulínico	$C_{30}H_{46}O_3$	472-15-1	
Ácido asiático	$C_{30}H_{48}O_5$	464-92-6	
Carnosol	$C_{20}H_{26}O_4$	5957-80-2	
Ácido 12-metoxicarnósico	$C_{21}H_{30}O_4$	3650-09-07	
Proantocianidinas			
Procianidina A2	$C_{30}H_{24}O_{12}$	41743-41-3	
Procianidina B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	29106-49-8	
Procianidina C1	$C_{45}H_{38}O_{18}$	37064-30-5	
Stilbenes			
Polidatina	$C_{20}H_{22}O_8$	65914-17-2	
Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	501-36-0	
Aldeídos Fenólicos			
3,4-di-hidroxibenzaldeído	$C_7H_6O_3$	139-85-5	
Siringaldeído	$C_9H_{10}O_4$	134-96-3	

Continuação Quadro 3 ...

Vanilina	$C_8H_8O_3$	121-33-5	
Ácidos benzoicos			
Ácido verátrico	$C_9H_{10}O_4$	93-07-2	
Ácidos cinâmicos			
Ácido trans cinâmico	$C_9H_8O_2$	140-10-3	
Outros compostos fenólicos			
Tirosol	$C_8H_{10}O_2$	501-94-0	
Arbutin	$C_{12}H_{16}O_7$	497-76-7	
Galato de etila	$C_9H_{10}O_5$	831-61-8	
Umbeliferona	$C_9H_6O_3$	93-35-6	
Ácido elágico	$C_{14}H_6O_8$	476-66-4	

Os resultados das análises cromatográficas qualitativas evidenciaram uma ampla diversidade em substâncias fenólicas, num total de 38 compostos identificados nos frutos avaliados. O perfil cromatográfico dos extratos dos frutos amazônicos foi determinado através da detecção e identificação por CLUE de diversos compostos fenólicos conhecidos (Tabela 15).

Tabela 15 - Perfil cromatográfico qualitativo de compostos fenólicos identificados através do tempo de retenção dos padrões correspondentes, usando diferentes métodos analíticos

Compostos Fenólicos		AB		AÇ		BA		BI		BU		CU		IN		PA		MO		UX	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Ácidos fenólicos																					
1	Ácido clorogênico	X						X	X	X	X			X	X	X	X	X		X	X
2	Ácido cafeico	X	X	X		X	X			X	X	X		X		X	X	X	X	X	X
3	Ácido 4-hidroxibenzóico	X		X		X		X		X		X		X		X		X		X	
4	Ácido-2,5-di-hidroxibenzóico	X		X		X	X	X	X	X				X	X	X		X		X	
5	Ácido ferúlico	X	X	X		X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
6	Ácido gálico	X				X				X	X					X	X	X		X	
7	Ácido homovanílico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
8	Ácido p-cumárico	X	X	X		X		X	X			X	X	X			X	X		X	
9	Ácido rosmarínico													X	X			X			
10	Ácido sinápico			X				X						X							
11	Ácido Siríngico			X	X			X	X			X		X	X					X	X
12	Ácido vanílico			X		X		X	X	X	X			X		X	X			X	
Flavonas																					
13	Cirsimaritina			X				X	X									X	X	X	
14	Quercetina		X	X						X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
15	Genkwanin			X						X						X	X				
16	Hesperidina															X	X			X	X
17	Homoplantaginina			X													X	X	X	X	X
18	Kaempferol	X	X	X		X		X		X	X	X				X	X	X		X	X
19	Hidrato de Morin		X	X						X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
20	Nepetin-7-glicosídeo	X								X	X			X				X			

Continuação Tabela 15...

21	Hidrato de quercitrina			X					X	X				X		X	X	X	X
22	Hidrato de rutina	X	X	X			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		
23	Taxifolina			X					X	X				X	X	X		X	X
Flavanols																			
24	(-)-Epicatequina	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Terpenos fenólicos																			
25	Rosmanol					X													
26	Ácido asiático													X	X			X	
27	Ácido Carnosico					X													
Aldeídos fenólicos																			
28	3,4-di-hidroxibenzaldeído	X		X		X		X		X		X		X		X		X	
29	Siringaldeído	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
30	Vanilina	X		X		X	X	X		X	X		X	X	X	X		X	
Ácidos benzóicos																			
31	Ácido Verátrico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Ácidos cinâmicos																			
32	Ácido trans-cinâmico			X			X	X			X		X	X				X	
Outros compostos fenólicos																			
33	Ácido D-(-)-quinico	X	X	X			X	X	X				X		X	X	X	X	X
34	Ácido elágico																	X	X
35	Galato de etila			X	X		X	X			X		X	X				X	X
36	Arbutin			X	X						X		X		X			X	
37	Ácido 4-o-cafeoilquínico	X					X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
38	Umbeliferona			X													X		X
TOTAL		18	12	28	6	16	6	21	16	23	18	17	8	23	16	25	20	22	9
																		30	20

Resultados obtidos em base seca. AB= abiu; AÇ= açaf; BA= bacuri; BI= biribá; BU= buriti; CU= cupuaçu; IN= inajá; PA= pajurá; MO= monguba; UX= uxi. M1 e M2 = métodos cromatográficos 1 e 2, respectivamente.

Comparando-se os métodos avaliados, observa-se que o método 1 permitiu a identificação de um grande número de compostos fenólicos, sendo maiores nos frutos de açaí e uxi (total de 28 e 30 compostos fenólicos, respectivamente). No entanto, alguns compostos foram identificados somente quando utilizado o método 2, tais como hidrato de morina e quercetina na amostra de abiu; vanilina na amostra de cupuaçu; nepetin-7-glicosídeo e hidrato de rutina na amostra de inajá; homoplantaginina e ácido p-cumárico na amostra de pajurá; umbeliferona na amostra uxi.

Entre os 10 frutos amazônicos estudados, somente as polpas dos frutos inajá e biribá e as sementes de monguba foram submetidos à determinação quantitativa de compostos fenólicos. O motivo dessa escolha foi o fato desses frutos terem apresentado relevantes efeitos antiproliferativos contra a linhagem celular de caco-2, além de elevada capacidade antioxidante e alto teor em compostos fenólicos após extração hidroetanólica ($> 400 \text{ mg EAG } 100\text{g}^{-1}$).

A Tabela 16 apresenta os resultados dessa análise quantitativa. No total, 11 compostos fenólicos foram quantificados na polpa de biribá, tendo sido observadas elevadas concentrações de ácido homovanílico e quínico ($414,4$ e $1031,6 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente). O ácido homovanílico é um importante metabólito de catecolaminas que ocorre em biofluidos humanos, sendo reportado por sua capacidade antioxidante (ALJOVIĆ; GOJAK-SALIMOVIC, 2017). No corpo humano, o ácido quínico tem sido caracterizado como um pró-metabólito que permite a indução de níveis eficazes de nicotinamida e triptofano no trato gastrointestinal, sendo uma fonte destes ingredientes metabólitos essenciais (PERO; LUND; LEANDERSON, 2009). Além disso, o ácido quínico possui um amplo espectro potencial como antioxidante, anti-inflamatório, hepatoprotetivo, entre outras propriedades medicinais (SOH *et al.*, 2003; PERO; LUND; LEANDERSON, 2009; XIANG *et al.*, 2001; INBATHAMIZH; PADMINI, 2013).

Tabela 16 - Quantificação de compostos fenólicos em amostras selecionadas de frutos amazônicos

Composto fenólico	Biribá	Inajá	Monguba
	mg kg ⁻¹		
Ácidos fenólicos			
Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico	0,5	0,5	0,6
Ácido 3,4-di-hidroxibenzaldeído 4-hidroxibenzóico	0,5	0,9	0,1
Ácido cafeico	1,5	3,6	52,9
Ácido clorogênico	4,8	10,8	215,2
Ácido ferúlico	Nd	2,1	11,5
Ácido gálico	Nd	Nd	1,9
Ácido homogentísico	Nd	0,4	0,5
Ácido homovanílico	414,3	Nd	Nd
Ácido p-cumárico	0,3	1,4	11,0
Ácido quínico	1031,6	34,2	571,9
Ácido Rosmarínico	Nd	4,1	Nd
Ácido sinápico	Nd	13,9	3,0
Flavonóides			
(-)-Galato de epigallocatequina	Nd	181,9	nd
(-)-Epicatequina	52,1	83,1	76,2
Procianidina C1	172,9	176,8	196,3
Fisetin	Nd	55,9	9,6
Kaempferol	Nd	0,2	0,1
Hidrato de Morin	Nd	84,6	83,0
Quercetina	Nd	4,4	10,0
Hidrato de rutina	4,6	0,9	21,7
Homoplantaginina	Nd	0,2	0,4
Nepetin-7-glicosídeo	Nd	45,1	65,1
Procianidina-A2	Nd	6,5	29,8
Estilbenos			
Polidatina	Nd	0,3	1,2
Resveratrol	Nd	1,3	nd
Outros compostos fenólicos			
Vanilina	Nd	24,2	nd
Arbutin	Nd	0,9	nd
Galato de etila	46,2	nd	nd

Método de preparo das amostras: M1. nd = não detectado..

Maior variabilidade em compostos fenólicos foi observada na polpa de inajá, compreendendo 25 compostos pertencentes às classes dos flavonóides, estilbenos, ácidos fenólicos, entre outros. Entre os compostos fenólicos, foi quantificada uma importante concentração de (-)-galato de epigallocatequina (EGCg), substância que possui ampla gama de propriedades medicinais, incluindo efeitos benéficos sobre a doença de Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, obesidade e diabetes. Tal composto possui também a capacidade de inibir a proliferação de algumas formas de câncer, e quando presente confere ao fruto elevada capacidade antioxidante (STUART; SCANDLYN; ROSENGREN, 2006; DU *et al.*, 2012). O EGCg está presente em um número limitado de alimentos e bebidas à base de vegetais. Arts, Putte e Hollman (2000) determinaram os níveis de algumas catequinas, incluindo EGCg, em 24 tipos de frutas, 27 tipos de vegetais e leguminosas, alguns alimentos básicos e alimentos processados consumidos na Holanda, mas nenhum dos alimentos continha EGCg.

Em uma pesquisa recente (MANOCHAI *et al.*, 2018), 10 cascas de cultivares de ata (*Annona squamosa* L.) provenientes da Tailândia foram avaliadas. Entretanto, o conteúdo apresentado foi notavelmente inferior (variando de 0,4 a 32 mg kg⁻¹) que o obtido para a polpa de inajá neste estudo (181,9 mg kg⁻¹) e superior às amostras de biribá e monguba, das quais não foram quantificados teores de EGCg. A polpa de inajá ainda apresentou um perfil diferenciado em estilbenos, em que se pode destacar o composto resveratrol, que possui atividade antimutagênica e capacidade em inibir a formação de radicais livres (MALTA *et al.*, 2012).

Observando-se os resultados das análises das sementes de monguba, um total de 21 compostos fenólicos foram quantificados, tendo sido observados maiores teores dos seguintes ácidos fenólicos: ácido 2,5-dihidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, gálico, homogentísico, p-cumárico e clorogênico. O ácido clorogênico é um composto derivado do ácido cafeico e exibe várias propriedades biológicas benéficas, incluindo efeitos antibacterianos, antiflogísticos, antivirais e inibitórios da carcinogênese no intestino grosso e no fígado (WANG *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2016). Os valores de ácido clorogênico encontrados neste estudo foram superiores àqueles relatados por Gordon *et al.* (2012) para a polpa de açaí (0,2 a 16,4 µg g⁻¹, massa seca).

Alguns frutos amazônicos têm sido avaliados quanto ao seu perfil cromatográfico em relação à presença de compostos fenólicos (STAFUSSA *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2016; MOURA, 2016; YAMAGUCHI, 2015; BERTO *et al.*, 2015b; PUGLIESE, 2010;

GONÇALVES, 2008; YANG *et al.*, 2003). Considerando as porções convencionalmente comestíveis dos frutos contemplados neste estudo, observa-se, na literatura, escassas informações acerca da presença e das quantidades relativas de compostos fenólicos em frutos de abiu, pajurá, bacuri e uxi, e nenhuma informação em relação às polpas dos frutos de biribá e inajá e as amêndoas de monguba.

Stafussa *et al.* (2018) avaliaram a composição em bioativos e a capacidade antioxidante de 44 frutos brasileiros tradicionais e exóticos, dentre eles açaí, buriti e cupuaçu. O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado segundo o método Folin-Ciocalteu, o teor de flavonóides e antocianinas monoméricas, bem como a capacidade antioxidante contra os radicais sintéticos DPPH[•] e ABTS^{•+} também foram determinados por métodos colorimétricos. A análise do perfil fenólico foi realizada pela injeção de extratos hidroetanólicos das amostras à CLAE acoplada a um detector de arranjo de diodos. Nos extratos das polpas dos frutos foram identificadas as seguintes classes de substâncias: cinco ácidos hidroxicinâmicos, com destaque ao elevado conteúdo de ácido clorogênico; três ácidos hidroxibenzóicos, com destaque para o ácido vanílico no açaí; quatro flavonóides, sendo a catequina a maior responsável pelo conteúdo de flavonóides nos frutos, e um estilbeno, o resveratrol, que apresentou maior conteúdo nos frutos de maçã e pêsego. Os autores destacaram as características mais importantes de cada polpa em relação à composição de compostos e suas atividades farmacológicas.

Gonçalves (2008) avaliou o potencial em compostos bioativos de 16 polpas de frutos (bacuri, tucumã, cupuaçu, graviola, buriti, uxi, cambuci, araçá, tamarindo, maracujá doce, granadilla, carambola, camu-camu, maná-cubiu, abiu e araçá-boi) e 6 polpas de frutos congelados (panã, umbu, cagaita, coquinho azedo, araçá e cambuci), todos frutos nativos brasileiros. Os teores de ácido elágico, vitamina C e flavonóides (catequina, epicatequina, quercetina, caempferol e cianidina) foram determinados por CLAE, enquanto a atividade inibitória da α -glicosidase e α -amilase foram determinadas por métodos espectrofotométricos. A capacidade antioxidante foi verificada pelos métodos DPPH, ORAC e descoramento pelo sistema β -caroteno/linoleico, e o teor de compostos fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu. Camu-camu, cupuaçu, coquinho azedo e cagaita revelaram os maiores teores em vitamina C. Camu-camu, cambuci, uxi, tucumã, cagaita, coquinho azedo e araçá apresenta/ram maiores potenciais antioxidantes. Os principais flavonóides encontrados nos frutos foram quercetina e catequina.

Observando-se os frutos que também foram contemplados no presente estudo, verificou-se que a polpa de buriti possui quercetina e ácidos hidroxicinâmicos, e abiu ácidos hidroxicinâmicos, enquanto não foram quantificados flavonóides nas polpas de uxi, cupuaçu e bacuri.

O trabalho contribuiu com informações sobre o potencial em bioativos de frutos nativos. Mais uma vez, destaca-se o poder nutricional e de equilíbrio trófico desses frutos e sua contribuição para a qualidade de vida nos ecossistemas amazônicos e pré-amazônicos, onde são encontrados os frutos aqui avaliados.

6.1.6 Resultados das análises de correlações quimiométricas

Uma análise de componentes principais (do inglês, *principal component analysis*, PCA) foi aplicada para caracterizar os dez frutos amazônicos de acordo com sua composição química e atividade biológica. No total, 23 variáveis foram avaliadas em dez (10) tipos de frutos, sendo as variáveis da matriz de correlação compostas por: seis (06) parâmetros bromatológicos (umidade, cinza, pH, acidez em ácido cítrico, lipídeos e proteínas); sete (07) minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e Zn); vitamina C, três (03) diferentes métodos de obtenção de extratos (CF-etOH, CF-KPBS e CF-KPBS:etOH), cinco (05) métodos para análises da capacidade antioxidante (DPPH, NBT, ABTS-etOH, ABTS-PBS e ABTS-PBS:etOH) e o ensaio de viabilidade celular.

As distribuições das variáveis ao longo das componentes principais PC1 vs PC2, PC1 vs PC3 e PC2 vs PC3 são apresentadas na Figura 17, 18 e 19, respectivamente. Da Figura 17, verificou-se que a porcentagem cumulativa da variância total explicada pelos dois primeiros componentes (PC1 vs PC2) foi de 51,82%. O gráfico de *scores* bidimensional mostra a formação de três agrupamentos principais: azul, verde e vermelho. No entanto, é importante salientar que a PCA não é uma classificação, mas pode ser usada como base para a mesma.

O agrupamento azul da Fig. 17 foi formado pelos frutos de buriti e uxi, que se distinguiram dos demais pelo menor conteúdo em compostos fenólicos, menor capacidade antioxidante e moderados efeitos antiproliferativos. Por outro lado, tais amostras destacaram-se em relação ao conteúdo bromatológico (elevados conteúdos em lipídeos, proteínas e energia) e mineral (teores relevantes em Cu, Mg e Mn).

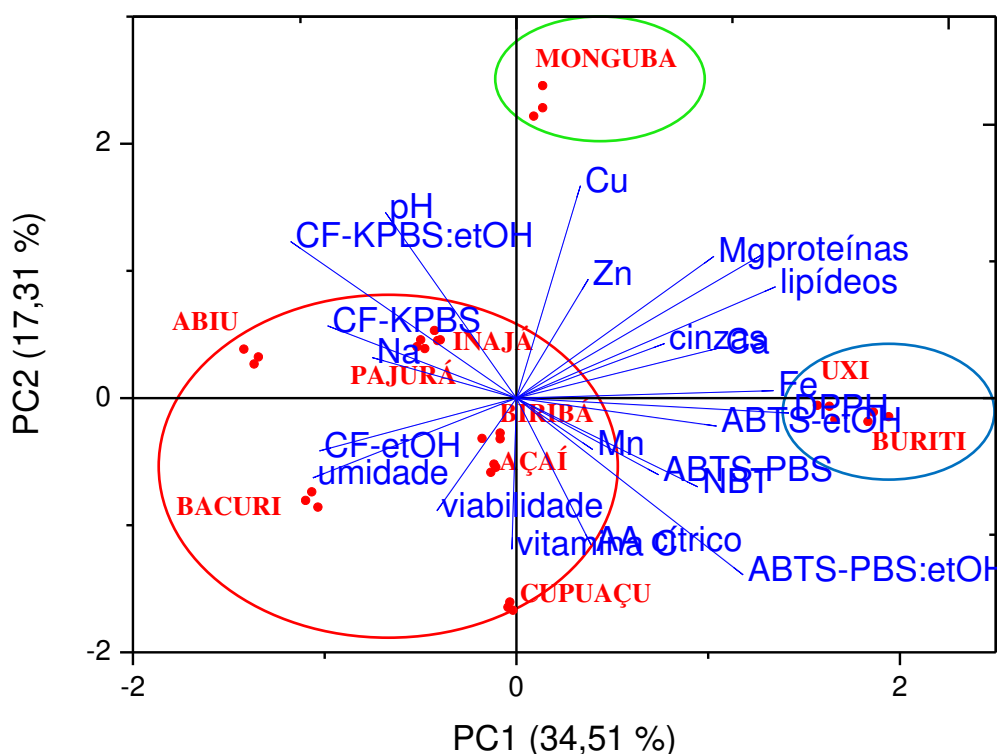


Figura 17 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) utilizando 23 variáveis.

O agrupamento em verde da Figura 17 foi formado unicamente pelas amêndoas da monguba. De fato, tal fruto apresentou importantes efeitos antiproliferativos, além de elevada capacidade antioxidante contra radicais $O_2^{\bullet-}$ e contra radicais $ABTS^{\bullet+}$ nos extratos hidroetanólico e aquoso. Além disso, a amostra de monguba apresentou um importante conteúdo em compostos fenólicos em todos os extratos, altos conteúdos em cinzas, lipídeos, proteínas, energia, Mg e Cu. Por outro lado, foram obtidos baixos teores em vitamina C. É importante observar que a porção da polpa foi a avaliada em todas as amostras, com exceção do fruto da monguba, em que se estudou as sementes. Além da dependência de fatores edafoclimáticos da região onde é produzido o vegetal, a composição química das sementes varia conforme a espécie botânica, a cultivar e, à semelhança dos demais órgãos da planta, as sementes apresentam composição química bastante variável (NETO; ROSSETTO, 1998), o que certamente diferencia este fruto dos demais estudados. A composição das amêndoas de monguba e seu potencial industrial nunca haviam sido revelados antes, como está sendo no presente trabalho. Trata-se de um fruto nativo, economicamente desvalorizado e com bem poucas informações sobre sua

composição química e atividades biológicas. A presença de fatores antinutricionais no fruto, relatada por Oliveira *et al.* (2000), necessita ser melhor esclarecida, tendo em vista ser um fruto utilizado como alimento pela população local.

Na Figura 18, o comportamento distinto mostrado pelo agrupamento vermelho foi formado pelos frutos inajá, açaí, bacuri, biribá, pajurá, cupuaçu e abiu. Foi possível determinas uma porcentagem cumulativa da variância total explicada pelos componentes PC1 vs PC3 de 48,40%.

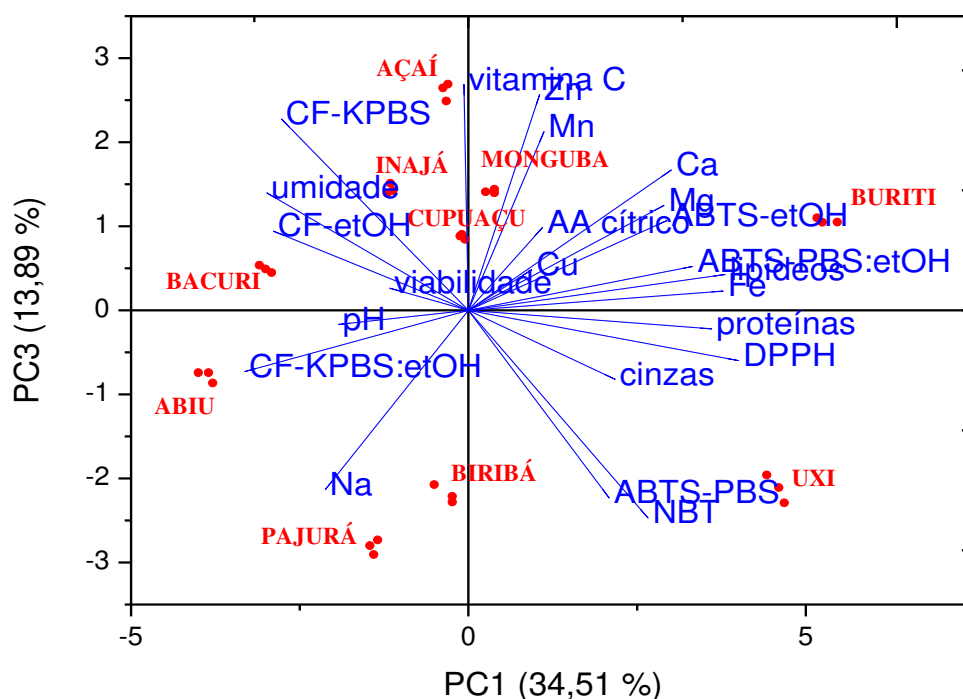


Figura 18 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 1 (PC1) e 3 (PC3) utilizando 23 variáveis.

Observando a dispersão das variáveis ao longo da PC1 e PC3 é possível notar com maiores detalhes as influências das variáveis sobre as amostras formadas pelo agrupamento vermelho da figura anterior (Figura 17), a qual contemplava grande parte dos frutos estudados. Destaca-se neste diagrama a variável vitamina C que contribuiu positivamente para a formação da PC3, destacando-se algumas amostras com alto teor neste nutriente: açaí, cupuaçu e inajá. Outras variáveis contribuíram para a formação da PC3, foram elas os elevados teores em Mn, Zn e compostos fenólicos (extrato aquoso) e, para essa componente, o agrupamento verde, formado pelas amostras de monguba, não

foi evidenciado. Além disso, o alto teor de Na na amostra de pajurá foi demonstrado pela contribuição negativa à PC3. A Figura 19 confirma a influência das variáveis nas amostras de frutos amazônicos.

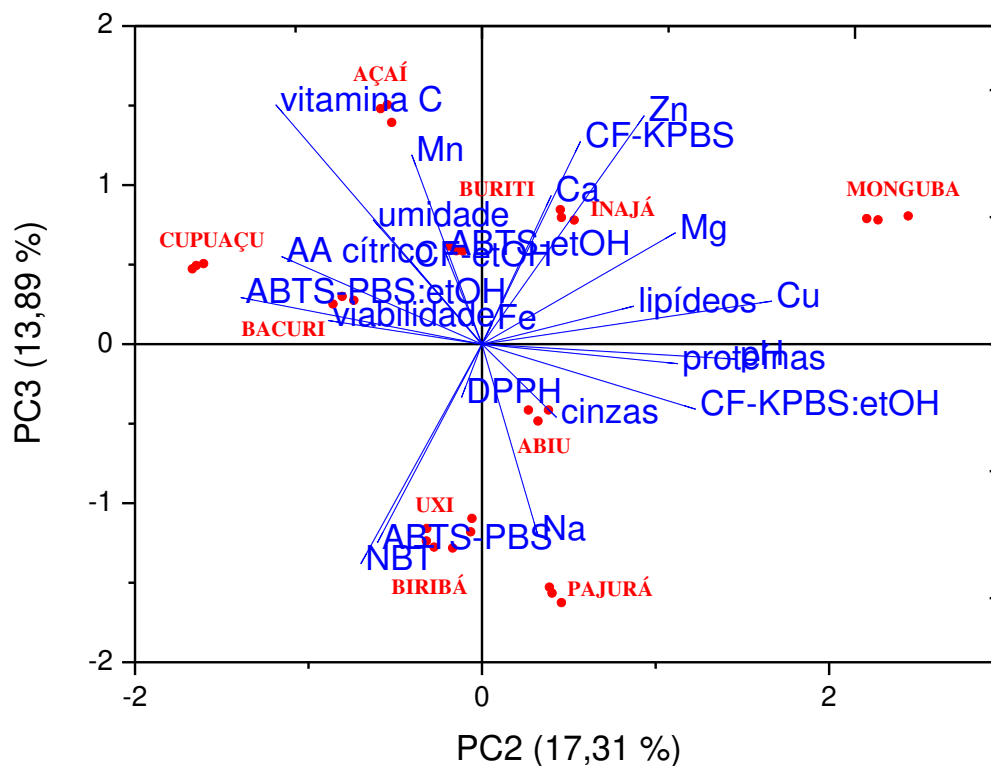


Figura 19 - Diagrama de dispersão da PCA: distribuição dos 10 frutos, em triplicata, ao longo dos componentes principais 2 (PC2) e 3 (PC3) utilizando 23 variáveis.

Estabelecendo-se uma correlação entre os resultados dos compostos bioativos, da capacidade antioxidante e da atividade antiproliferativa (Tabela 17), evidenciou-se, como esperado, um forte efeito da concentração total de compostos fenólicos sobre a capacidade antioxidante, tais como $R^2 = -0,90$ para CF (KPBS) e ABTS (PBS), $R^2 = -0,98$ para Folin (K-PBS: etOH) e ABTS (PBS: EtOH), $R^2 = -0,74$ para Folin (K-PBS) e NBT (K-PBS). Os resultados da correlação foram negativos em virtude de os resultados da capacidade antioxidante estarem expressos em IC_{50} (e neste caso, quanto menor a IC_{50} , maior a capacidade antioxidante), enquanto que a concentração de compostos fenólicos foi expressa em $mg\ EAG\ 100g^{-1}$. Desta forma, sugere-se que, nesse ponto da análise, as comparações dos coeficientes de correlação (R^2) sejam feitas com valores modulares.

Tabela 17 - Correlação entre os resultados obtidos para os compostos bioativos, a capacidade antioxidante e a atividade antiproliferativa para os frutos amazônicos estudados

	DPPH	ABTS etOH	ABTS PBS	ABTS PBS:etOH	NBT	CF etOH	CF etOH:KPBS	CF KPBS	Viabilidade	Vit. C
DPPH	1,00									
ABTS _{etOH}	0,57	1,00								
ABTS _{PBS}	0,27	0,15	1,00							
ABTS _{PBS:etOH}	0,69	0,56	0,41	1,00						
NBT	0,72	0,14	0,60	0,57	1,00					
CF _{etOH}	-0,47	-0,41	-0,51	-0,33	-0,21	1,00				
CF _{etOH:KPBS}	-0,68	-0,45	-0,33	-0,98	-0,55	0,30	1,00			
CF _{KPBS}	-0,52	-0,15	-0,90	-0,53	-0,74	0,65	0,47	1,00		
Viabilidade	-0,03	0,27	-0,41	0,10	-0,15	0,17	0,00	0,31	1,00	
Vit. C	-0,14	0,01	-0,15	0,43	-0,27	0,11	-0,45	0,08	0,09	1,00

CF=compostos fenólicos. etOH = extratos etanólicos. K-PBS:etOH = extratos hidroetanólicos (1:1). K-PBS= extratos em solução tampão K-PBS-EDTA (pH 7,5).

DPPH, ABTS, NBT = métodos espectrofotométricos empregados na determinação da capacidade antioxidante (vide parte experimental).

Os resultados da correlação sugerem que o conteúdo fenólico foi o principal responsável pela capacidade antioxidante dos extratos dos frutos. Na literatura, tem sido amplamente discutida a eficiência de tais compostos atuando como antioxidantes, sendo considerados os maiores responsáveis pela capacidade antioxidante de diversos frutos, vegetais e grãos. A estrutura química básica das substâncias fenólicas mostra-se ideal para os seguintes processos bioquímicos: quelação de metais, em virtude de os compostos fenólicos possuírem grupamentos hidroxila e carboxila, capazes de se ligar especialmente ao ferro e ao cobre; inibição da peroxidação lipídica, mediante aprisionamento do radical alcoxila lipídico; neutralização das EROs, devido à capacidade dos compostos fenólicos de doarem elétrons ou átomos de hidrogênio (LI *et al.*, 2014; ARAGÃO, 2013; JIMÉNEZ; MARTÍNES; FONSECA, 2009; MICHALAK, 2006).

6.2 Desenvolvimento de um Biossensor: Determinação Rápida da Capacidade Antioxidante

Os métodos colorimétricos descritos e empregados nesse trabalho têm sido amplamente utilizados na determinação da capacidade antioxidante de diversas matrizes, sejam elas compostas de vegetais *in natura* (MONTERO *et al.*, 2018; VIRGOLIN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016; DEMIRDOVEN *et al.*, 2015; MANDAVE *et al.*, 2014; CANUTO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010), bem como de alimentos processados, tais como bebidas (GARCÍA-LOMILLO; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2014; COLINA *et al.*, 2012;), chás (MILANIA; AMUZADEHB; MOETAMEDZADEGAN, 2018; KOCZKA *et al.*, 2016; AKRAM *et al.*, 2012) e azeite de oliva (MINIOTIA; GEORGIO, 2010). Convém mencionar, no entanto, que tais métodos são ainda caros e relativamente demorados, mesmo utilizando-se a estratégia da leitura em placas, que possibilita múltiplas e simultâneas análises. Além disso, essas metodologias analíticas dificilmente poderiam ser empregadas *in situ*, pois exigem em geral equipamentos de porte relativamente grande, tanto para preparo das amostras quanto para as leituras espectrofotométricas.

Por esse motivo, essa etapa do trabalho objetivou inicialmente projetar um biossensor eletroquímico que fosse capaz de realizar essa tarefa com o mínimo tratamento da amostra, com capacidade de portabilidade, e que resultasse em um menor custo analítico.

6.2.1 Caracterização eletroquímica do biossensor

O sensor-base, empregado para a construção do biossensor, compreendeu um suporte flexível e quimicamente inerte (PVC) no qual três (3) eletrodos, incluindo eletrodo de trabalho, pseudoeletrodo de referência e eletrodo auxiliar, foram impressos através de uma metodologia de produção simples baseada na serigrafia semiautomática. A tecnologia da serigrafia é uma técnica bem estabelecida para a fabricação de sistemas de eletrodos econômicos, descartáveis e portáteis, o que possibilita a análise *in situ*. O processo de preparo desse tipo de sensor-base é bem conhecido e já foi descrito em artigos (HAYAT; MARTY, 2014; LI *et al.*, 2012). As fotos B6 e B7 do Anexo B esquematizam as etapas de deposição das camadas que formam o sensor eletroquímico, durante o processo de serigrafia.

No sensor-base empregado, o eletrodo auxiliar foi formado pela deposição de uma pasta de carbono grafite comercial; o eletrodo de trabalho, de uma pasta de grafite comercial contendo o sal *Prussian Blue* (PB) como mediador eletroquímico, e o pseudo eletrodo de referência, de uma pasta de Ag/AgCl. O eletrodo de trabalho pode ser considerado o mais importante, pois é nele que as reações eletroquímicas são monitoradas, enquanto que os eletrodos de referência e auxiliar (contra-eletrodo) são usados para completar o circuito eletrônico, possibilitar a realização de medidas em potencial fixo e realizar a transferência de elétrons ao transdutor (potenciostato) (HAYAT; MARTY, 2014).

Graças à característica particular do mediador PB em catalisar a redução do peróxido de hidrogênio, biossensores serigrafados, à base de enzimas oxidase, modificados pelo composto inorgânico PB têm sido desenvolvidos para aplicações em análises clínicas (JIANG *et al.*, 2016; BOFFI, 2015; SEKAR *et al.*, 2014) e de alimentos (ALBANESE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2003). Uma busca recente no portal de periódicos da CAPES resultou em mais de mil artigos sobre biossensores serigrafados modificados com PB com base em diferentes materiais de eletrodos, procedimentos de modificação e princípios de medição. Artigos que lidam com biossensores para análise de glicose, lactato, colesterol e outros analitos fisiológicos foram encontrados em periódicos de química analítica (JIANG *et al.*, 2016; BOFFI, 2015; SEKAR *et al.*, 2014; HIRST *et al.*, 2013; BANERJEE; SARKAR; TURNER, 2013; CHIU *et al.*, 2009). Além disso, o uso do PB no desenvolvimento de sensores e biossensores para análise de

alimentos tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa e conduzido a métodos aperfeiçoados para detecção de biocompostos como sacarose e galactose, bem como para determinação da capacidade antioxidante (ALBANESE *et al.*, 2014; VARVARI; POPESCU, 2010; WANG *et al.*, 2003; HAGHIGHI *et al.*, 2004).

A avaliação da capacidade antioxidante utilizando o biossensor desenvolvido baseia-se na monitoração *on-line* do H_2O_2 produzido durante o processo de oxidação de uma solução aquosa de hipoxantina (HX) à ácido úrico, na presença da enzima xantina-oxidase (XOD), ou pela espontânea dismutação dos radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ como demonstrado na Figura 20.

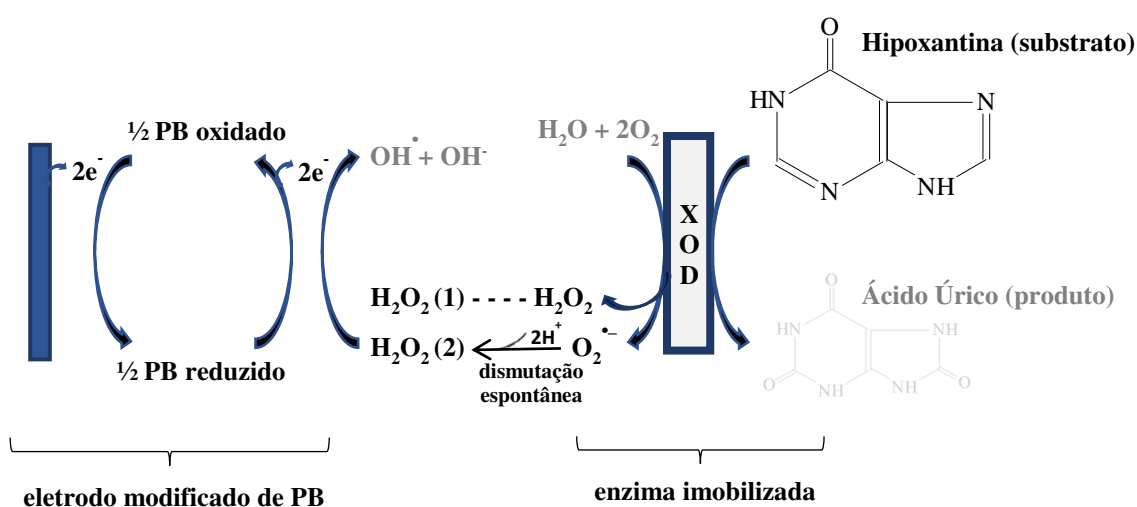


Figura 20 - Princípio de detecção do H_2O_2 gerado pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina-oxidase (HX/XOD), usando o biossensor amperométrico.

O H_2O_2 gerado por ocasião da reação enzimática é reduzido na superfície do eletrodo de trabalho polarizado ($-100 \text{ mV vs Ag/AgCl}$), na presença de mediador azul da Prússia (PB). Este tem um efeito catalítico conhecido sobre a redução de H_2O_2 , devido à sua estrutura química propícia (RICCI; PALLESCHI, 2005). Na presença de antioxidantes, os radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são inibidos, com a consequente diminuição da corrente catódica, sendo tal diminuição proporcional à capacidade antioxidante.

Muitos trabalhos já demonstraram a forte influência da modificação de materiais nas propriedades catalíticas ou elétricas dos eletrodos (GARCIA *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ; RIVAS, 2002; MOUSTY, 2004). De fato, a melhoria das propriedades elétricas, pode levar a menores correntes capacitivas e melhor sensibilidade do sensor.

Esta influência foi evidenciada pela avaliação do comportamento eletroquímico do eletrodo impresso não modificado e modificado com PB (Figura 21).

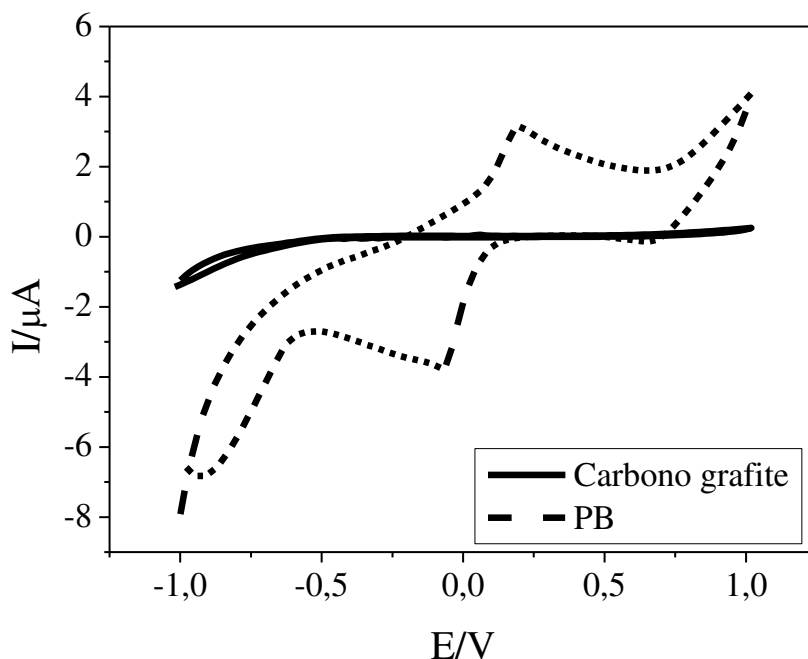


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de carbono na ausência/presença de mediador de PB. Medidas eletroquímicas realizadas em solução tampão K-PBS 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) com KCl 10 mmol L⁻¹ a uma taxa de varredura de 50 mVs⁻¹ vs Ag/AgCl.

Foi possível observar claramente na Figura 21 que, com a modificação do eletrodo de carbono com o mediador PB, houve uma alteração expressiva da resposta do eletrodo de trabalho. Observou-se a formação de um potencial de pico catódico a + 197 mV e de um pico anódico a - 73 mV.

Com esses resultados, favoráveis à resposta eletroquímica do biossensor, foram selecionados dois valores de potencial de trabalho (-50 mV e - 100 mV) e monitorada a corrente gerada durante a reação enzimática, ao longo do tempo e com adições crescentes do substrato HX (Figura 22). Observou-se que maiores teores de hipoxantina no meio reacional resultaram em menores intensidades de corrente, em termos negativos.

Verificou-se ainda que, fixando-se o potencial de trabalho a - 100 mV, a forma reduzida do mediador de PB foi capaz de favorecer, de forma mais intensa, a redução do H₂O₂ na superfície do eletrodo de trabalho. Na prática, esse valor de potencial de trabalho fixo pode ser considerado bastante apropriado para tomada das medidas eletroquímicas: por ser relativamente baixo, reduz-se a possibilidade de ocorrência de interferências

eletroquímicas externas, de modo que se pode dispensar o uso de gaiolas de Faraday durante a realização das medidas cronoamperométricas (SOUZA, 2003).

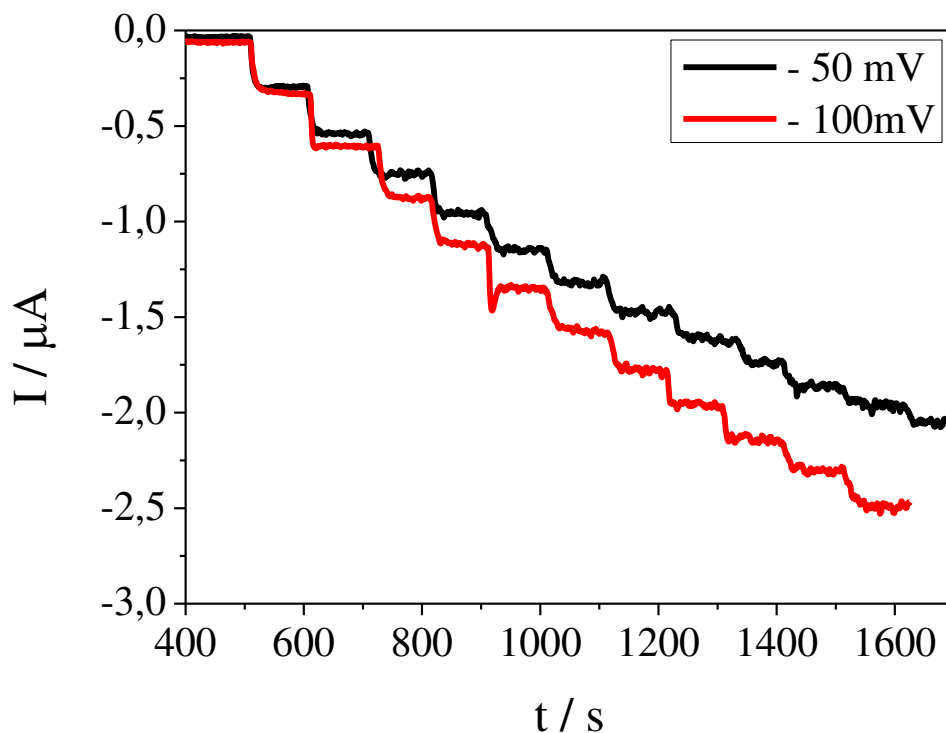


Figura 22 - Resposta do biossensor amperométrico com a adição sucessiva de HX em diferentes potenciais. A eficiência analítica é evidenciada.

Ao se transformar as respostas da Figura 22 em curvas, observam-se faixas lineares mais amplas e uma melhor sensibilidade do biossensor, expressa pelos coeficientes angulares, quando se fixa o potencial de trabalho em - 100 mV, conforme dados da Tabela 18.

Tabela 18 - Eficiência analítica do biossensor em diferentes potenciais de trabalho, expressa em sensibilidade e linearidade

Potential (mV)	Sensibilidade	R ²	Faixa linear (μmol L ⁻¹)
-50	-2,13E-8	0,992	1,0-60
-100	-2,72E-8	0,997	1,0-75

Vale ressaltar que, do ponto de vista analítico, uma maior faixa linear de trabalho possibilita inúmeras alternativas de uso do protótipo desenvolvido, em função das variabilidades de capacidades antioxidantes. Efeitos semelhantes na faixa linear e sensibilidade, em biossensores amperométricos, usando-se eletrodos impressos modificados com PB foram obtidos, fixando-se o potencial de trabalho em -100 mV, de modo que essa característica do mediador já tem sido bastante discutida (BANERJEE; SARKAR; TURNER, 2013; BOFFI, 2015).

Não é conveniente estabelecer uma comparação entre o desempenho dos biossensores anteriormente citados e o proposto aqui, tendo em vista que alguns fatores, tais como pH, enzima, substrato e moléculas alvo são completamente diferentes. Vale a pena frisar, no entanto, que uma faixa de potencial entre 0 e -200 mV é bastante desejável, quando o foco do sistema eletroquímico é a determinação da capacidade antioxidante, haja vista a redução do oxigênio molecular em potenciais inferiores a -200 mV, bem como a oxidação de compostos antioxidantes em potenciais superiores a 0 mV, tais como compostos fenólicos e outras substâncias eletroativas que estão frequentemente presentes em amostras reais, e que podem também ser oxidadas fornecendo sinais interferentes (ROSATTO *et al.*, 2001).

Entre os efeitos desejáveis da mediação do PB é possível incluir a sua natureza zeolítica, com uma célula unitária cúbica de 10,2 Å e com diâmetros de canal de cerca de 3,2 Å, que permite a difusão de moléculas de baixo peso molecular (como O₂ e H₂O₂) até o seu centro catalítico, excluindo moléculas de maior peso molecular (RICCI; PALLESCHI, 2005; ITAYA; ATAKA; TOSHIMA, 1982; LUDI; GÜDEL, 1973). O efeito eletrocatalítico do mediador PB sobre a redução do H₂O₂ foi confirmado por Varvari e Popescu (2010) que propuseram um sensor amperométrico modificado com PB para avaliação da atividade antioxidante a -0,1 V/Ag/AgCl, KCl_{sat}. Foi confirmado, também, no presente trabalho.

A seletividade e a atividade mediadora do PB são comparáveis àquelas de um componente biológico, porém esse mediador possui vantagens adicionais, que são inerentes às espécies inorgânicas, tais como baixo custo, alta estabilidade em determinadas condições, facilidade de modificação da superfície do eletrodo e nenhum efeito de saturação para o substrato (RICCI; PALLESCHI, 2005). Além disso, a incorporação do mediador PB ao eletrodo de trabalho, em especial via adsorção ou eletrodeposição, tem sido descrita como um processo simples, rentável e altamente

estável em meios reacionais ácido e neutro (MUREȘAN; TURDEAN; POPESCU, 2008; ADHOUM; MONSER, 2008; ALEGRET; MERKOÇI, 2007).

Uma vez caracterizado o eletrodo de trabalho, convém tecer alguns comentários acerca do pseudoeletrodo de referência empregado no sistema do biossensor proposto. Um pseudoeletrodo de referência consiste em um eletrodo que está em contato direto com o eletrólito, o que nem sempre garante um equilíbrio termodinâmico. No caso do biossensor que opera em um sistema de três eletrodos, tendo sido o pseudoeletrodo de referência formado da mistura Ag/AgCl, nenhuma corrente fluiu através deste e, portanto, seu potencial manteve-se realmente inalterado durante o experimento. Além disso, a concentração fixa de Cl^- na solução tampão de K-PBS (pH 7,5), empregada como solvente no preparo de todas as soluções, e também como eletrólito no decorrer das medidas cronoamperométricas, garantiu uma diferença de potencial igualmente fixa entre o pseudoeletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrólito (INZELT, 2013).

6.2.2 Otimização do processo de imobilização enzimática

O PVA-AWP tem sido utilizado com sucesso para a imobilização de enzimas na superfície de eletrodos impressos, oferecendo várias vantagens, tais como melhor elasticidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade com enzimas, estabilidade mecânica a longo prazo e biodegradabilidade (BEESABATHUNI, 2010; STOYTCHIEVA *et al.*, 2016). No entanto, a espessura do filme, a concentração do polímero e o grau de polimerização (que depende do tempo de exposição à luz), são parâmetros que afetam as propriedades de retenção da enzima no polímero e a permeabilidade de substratos enzimáticos e dos produtos da reação enzimática (STOYTCHIEVA *et al.*, 2016).

As condições de biofuncionalização, em termos de concentração do polímero, tempo de irradiação e carga enzimática foram otimizadas por modelagem quimiométrica. Para tal, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada para ajustar os seguintes fatores: carga enzimática (C_{XOD}); proporção enzima:polímero (R_{XP}) e tempo de polimerização (T_{P}), de forma a otimizar a imobilização da enzima sobre o eletrodo de trabalho modificado com PB. O desenho de *Box-Behnken* foi usado, aplicando 3 níveis (alto, central e baixo) para C_{XOD} , sendo empregadas as seguintes cargas enzimáticas: 5,0, 8,0 e 10,0 mU por eletrodo de trabalho; para R_{XP} , foram testadas as seguintes proporções: 1:2 (0,33), 1:1 (0,50) e 2:1 (0,66), e para T_{P} foram testados os tempos de 48, 24 e 0,5 h.

Convém mencionar que, em relação à atividade da enzima por eletrodo, uma unidade (1,0 U) significa que, com a quantidade de enzima imobilizada, é gerada 1 μmol de produto em um (1,0) minuto de reação.

Quinze (15) conjuntos de ensaios foram gerados pelo programa Statistica e, portanto, quinze (15) eletrodos foram construídos. Cada biossensor foi testado mediante realização do ensaio que se segue: o eletrodo foi imerso em uma célula de vidro contendo 10 mL de uma solução tampão K-PBS 50 mmol L^{-1} contendo KCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,5), sob agitação constante. Foi aplicado um potencial de trabalho de -100 mV e a corrente monitorada até que o estado estacionário fosse atingido. Concentrações crescentes do substrato (hipoxantina, HX) foram adicionadas, sendo então registradas as intensidades de corrente, até que se atingisse o patamar de saturação, isto é, até que os resultados se mantivessem iguais.

Para a montagem dos dados experimentais, foram testados modelos lineares (L) e quadráticos (Q). Um valor não significativo ($p < 0,05$) foi encontrado em todos os fatores para o modelo linear (Tabela 19), que mostrou um valor de R^2 predito (0,99887) em razoável concordância com o valor de R^2 ajustado (0,99773). Além disso, a falta de ajuste no valor de F (1,792) implicou num valor significativo ($p > 0,05$) e representou a validade do modelo linear para a explicação dos dados experimentais, o qual foi utilizado no presente estudo.

Tabela 19 - Análise de ANOVA para o estudo de otimização da imobilização enzimática em relação aos fatores C_{XOD} , R_{XP} e T_P

Fatores	Soma dos quadrados	Gl	Média dos quadrados	F	P
C_{XOD} (L)	6432	1	6432,2	19,866	0,011185*
C_{XOD} (Q)	291	1	291,1	0,899	0,396711
R_{XP} (L)	112664	1	112664,2	347,965	0,000049*
R_{XP} (Q)	924	1	924,1	2,854	0,166409
T_P (L)	959762	1	959761,7	2964,240	0,000001*
T_P (Q)	25892	1	25892,4	79,969	0,000865*
Falta de ajuste	1741	3	580,2	1,792	0,287985
Erro	1295	4	323,8		
Total	2676986	14			

gl: grau de liberdade, F: função de Fisher, p: nível de significância. * Valores não significativos ($p < 0,05$).

Resultados importantes dos efeitos das mudanças simultâneas nos valores de C_{XOD} , R_{XP} e T_P são fornecidos pelo Gráfico de Pareto (Figura 23) que mostra a ordem e significância de como cada variável afeta na resposta da intensidade da corrente gerada pelo biossensor amperométrico. Os diagramas de superfície de resposta para os parâmetros estudados, mostrados na Figura 24, corroboram com as conclusões a seguir apresentadas.

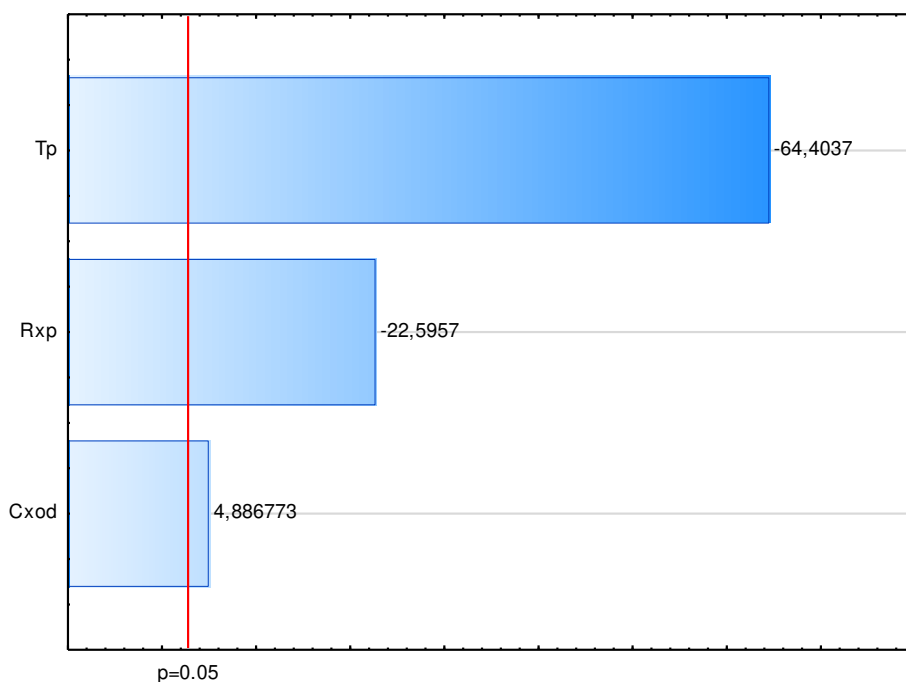


Figura 23 - Diagrama de Pareto representando a análise de ANOVA para componentes lineares dos parâmetros avaliados. Resultados significativos para $p > 0,05$.

Com relação ao efeito de cada variável na resposta do biossensor (Figura 23), as duas variáveis denominadas T_P e R_{XP} afetam negativamente a resposta de intensidade da corrente, enquanto C_{XOD} afeta positivamente na produção de ROS. Ainda, observa-se a ordem de significância de influência neste processo $T_P > R_{XP} > C_{XOD}$.

Como mostrado na Figura 24A, as variáveis R_{XP} e C_{XOD} foram determinantes na superfície de resposta. À medida que R_{XP} diminuiu, os valores da intensidade da corrente aumentaram, revelando que, para uma mesma concentração de enzima (C_{XOD}), maiores quantidades de PVA-AWP são importantes para garantir o aprisionamento da enzima. Ainda, o aumento da C_{XOD} aumenta a intensidade do sinal gerado.

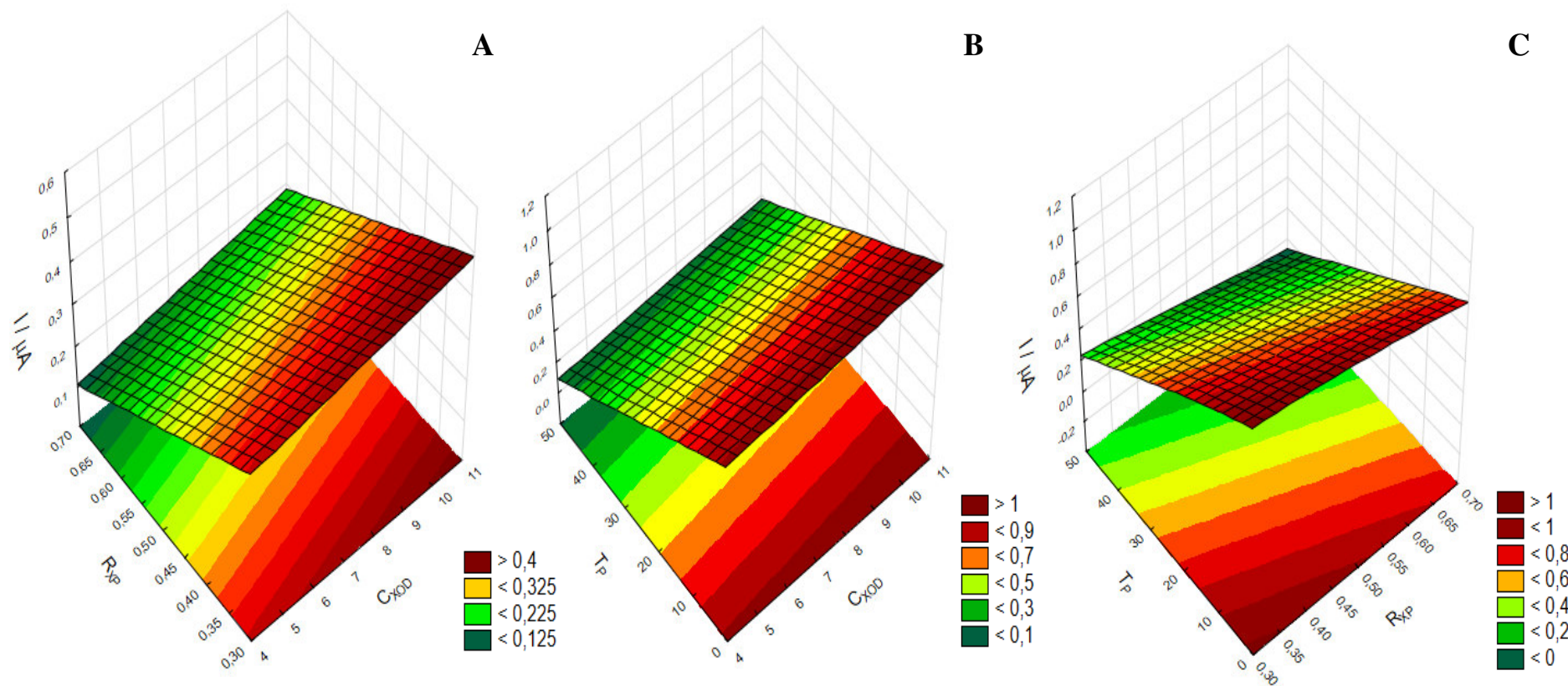


Figura 24 - Diagramas de superfícies de respostas mostrando correlações entre: (A) razão enzima:polímero (R_{XP}) com a carga enzimática (C_{XOD}); (B) tempo de foto polimerização (T_p) com a carga enzimática (C_{XOD}), e (C) razão enzima:polímero (R_{XP}) com o tempo de foto polimerização (T_p).

Em relação à Figura 24B, percebeu-se que a intensidade da corrente aumentou com o a diminuição do T_P , o que mostra que o tempo de polimerização influenciou significativamente na resposta do biossensor, possivelmente devido à perda da atividade enzimática com a exposição prolongada à luz durante o processo de polimerização em PVA-AWP. Foram testados ainda, os tempos adicionais de 4 h, 2 h e 1 h, mas os resultados não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do tempo de meia hora (0,5 h) e, por este motivo, este último mostrou ser um tempo satisfatório para assegurar o encapsulamento da enzima XOD na estrutura do PVA-AWP. Nestes testes adicionais, observou-se que, para um valor fixo de T_P , o aumento da C_{XOD} resultou em um inexpressivo aumento na intensidade de corrente gerada. Por outro lado, para $T_P = 0,5$ h, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sinais gerados, quando empregadas cargas enzimáticas de 8,0 e 10,0 mU.

Como mostrado na Figura 24C, conforme a razão R_{XP} diminuiu, a intensidade da corrente aumentou. Além disso, à medida que o T_P diminuiu, o sinal aumentou, em virtude da manutenção da atividade da enzima XOD, mesmo em um tempo de polimerização reduzido.

Através desse experimento, foi possível otimizar as condições operacionais para preparo do biossensor. Os fatores com efeito negativo foram então fixados para os níveis mais baixos, isto é, $T_P = 0,5$ h e $R_{XP} = 0,33$, enquanto que o fator C_{XOD} , que exerceu um efeito levemente positivo na produção de EROs, foi mantido no nível central (8 mU enzima por eletrodo). Fixando-se essas condições ótimas de T_P e R_{XP} , as medições empregando o biossensor preparado com carga enzimática de 8 mU não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), em relação às respostas cronoamperométricas, quando comparadas àquelas obtidas com o mais alto nível de carga enzimática (10,0 mU).

Pode-se afirmar que a imobilização da enzima XOD usando PVA-AWP mostrou ser uma excelente estratégia para a biofuncionalização do eletrodo impresso em PVC, por ocasião da construção do biossensor voltado à determinação da capacidade antioxidante de amostras naturais. De fato, o polímetro mostrou compatibilidade enzimática e assegurou o aprisionamento da enzima num período de tempo reduzido de foto polimerização.

Diversos biossensores serigrafados têm sido desenvolvidos empregando com êxito o fotopolímero PVA-AWP no processo de imobilização de variadas enzimas, tais como tirosinase, proteína fosfatase e acetilcolinesterase (STOYTCHIEVA *et al.*, 2016;

EL-MOGHAZY *et al.*, 2016; MISHRA *et al.*, 2015; CATANANTE; ESPIN; MARTY, 2015; ESPINNOZA *et al.*, 2014).

Stoytcheva *et al.* (2016) empregaram o fotopolímero PVA-AWP como matriz de imobilização da enzima tirosinase no desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a determinação de dopamina. Diferentes sensores-base foram avaliados, assim como as condições de biofuncionalização foram otimizadas em função da concentração da solução de PVA-AWP (1,5%, 3% e 6% em massa) e tirosinase (1 mg mL^{-1}) para uma razão 1:1 e do tempo de irradiação UV (15, 30 e 60 min) seguido de 3 h de secagem e enxague com água destilada. As condições foram definidas para PVA-AWP a 3% e 60 min de irradiação UV, e todos os sensores-base avaliados mostraram eficiência analítica em termos de faixa dinâmica, LOD, sensibilidade, reprodutibilidade, entre outros. A carga enzimática depositada na superfície do eletrodo de trabalho é essencial na construção do biossensor pois uma alta carga enzimática pode fornecer uma elevada resposta eletroquímica enquanto que uma baixa carga pode fornecer limites de detecção mais elevados. Consequentemente, é importante avaliar diferentes cargas enzimáticas, a fim de se obter uma resposta significativa e uma alta sensibilidade (CATANANTE; ESPIN; MARTY, 2015). Além disso, o tempo de irradiação empregado foi superior ao obtido neste estudo, e a etapa adicional da secagem, com duração de 3 h, elevou ainda mais o período para construção do dispositivo. Possivelmente a especificidade enzimática pode estar relacionada a necessidade de um maior grau de reticulação do fotopolímero a fim de assegurar seu aprisionamento.

Mishra *et al.* (2015) desenvolveram um biossensor de fluxo automático para detecção de misturas organofosforadas no leite. Acetilcolinesterases geneticamente modificadas (B394 e B4) foram usadas como elementos de bioreconhecimento na construção de dois biossensores. Cada enzima foi imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho por aprisionamento na matriz polimérica de PVA-AWP. Foram depositados na superfície do eletrodo de trabalho $3 \mu\text{L}$ de solução enzimática formada por 30% de enzima e 70% de PVA-AWP, de modo a imobilizar 1 mU de enzima por eletrodo. Posteriormente, os eletrodos foram expostos à luz de neon (15W) por 4 h a 4°C para promover a fotopolimerização entre grupos de azidas. Após secagem por 72 h, na mesma temperatura, os biossensores estavam prontos para uso. Comparando o procedimento de imobilização utilizado com o utilizado aqui, observa-se uma certa concordância da razão

enzima:PVA-AWP, uma menor carga enzimática e um período de exposição a luz de neônio muito maior na construção do biossensor proposto por Mishra *et al.* (2015).

Em todos os trabalhos observa-se a facilidade e eficiência da imobilização enzimática ao empregar o fotopolímero PVA-AWP, além da economia envolvida em razão da redução de perdas da atividade da enzima imobilizada, quando comparado a outros procedimentos de imobilização, como por exemplo ao utilizar glutaraldeído como agente de reticulação (BEESABATHUNI, 2010). Além disso, o PVA-AWP exibe maior fotorreatividade e propriedades de intumescimento mais baixas em comparação com outros fotopolímeros similares, solúveis em água, como o poli (álcool vinílico) substituído por grupos estirilpiridínicos (PVA-SbQ) (STOYTCHIEVA *et al.*, 2016; ROUILLON; TOCABENS; MARTY, 1994).

Na literatura são reportados trabalhos envolvendo o desenvolvimento de alguns biossensores que avaliaram o potencial de inibição de amostras variadas contra as EROS ($O_2^{\cdot-}$ e/ou H_2O_2) geradas pelo catalisador oxidativo XOD e seus substratos enzimáticos xantina (XA) ou HX, em que vantagens e desvantagens são observadas (CAMPANELLA *et al.*, 2013; LATES; MARTY; POPESCU, 2011; CORTINA-PUIG *et al.* 2010; CORTINA-PUIG *et al.* 2009; CAMPANELLA *et al.*, 2009; CAMPANELLA *et al.*, 2004a; CAMPANELLA *et al.*, 2004b; CAMPANELLA *et al.*, 2003; CAMPANELLA; BONANNI; TOMASSETTI, 2003; CAMPANELLA *et al.*, 2001). Em geral, esses biossensores apresentam diferenças em relação aos seguintes aspectos: interação entre a molécula antioxidante e a superfície do eletrodo; constituição material dos eletrodos e das espécies eletroativas usadas em suas modificações; sistema enzimático aplicado, por vezes empregando sistemas bienzimáticos (combinação de XOD e uma segunda enzima, geralmente citocromo C ou superóxido dismutase (SOD) para interagir com radicais $O_2^{\cdot-}$ e produzir H_2O_2); técnica de imobilização e/ou uso da enzima em solução; potencial aplicado; protocolo de preparo do biossensor (tempo, número de etapas, reagentes); desempenho analítico; aplicabilidade do biossensor em amostras reais, entre outros.

6.2.3 Eficiência do biossensor amperométrico

As condições de desempenho do biossensor amperométrico à base da enzima XOD é mostrada na Tabela 20. A precisão foi avaliada por meio de dez (10) ensaios sucessivos com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HX, na ausência e na presença do antioxidante de

referência. Os resultados dos coeficientes de variação, na ausência e presença de antioxidante, foram de 5,3 e 13,1%, respectivamente, e demonstraram uma boa repetitividade nas respostas.

Tabela 20 - Eficiência analítica do biossensor eletroquímico desenvolvido

Parâmetros analíticos	Ausência do Antioxidante	Presença do antioxidante**
Curva analítica*	$I = (-2,72 \times 10^{-8}) C_{HX} - 1,17 \times 10^{-7}$	$I = (1,89 \times 10^{-8}) C_{HX} - 10^{-7}$
Coeficiente de correlação (R^2)	0,997	0,972
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,0 – 75	-
Precisão em CV (%)	5,3	13,1
Tempo de resposta (s)	< 100	< 100
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,2	0,7
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	7,2	2,4

*I = intensidade da corrente (A) e C_{HX} = concentração do substrato hipoxantina (HX, em $\mu\text{mol L}^{-1}$);

**12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido gálico.

Para o sistema biossensor desenvolvido, os parâmetros LOD e LOQ foram calculados pela razão do desvio padrão do branco (calculado a partir de 10 determinações) e a inclinação da curva analítica (m), multiplicado pelo fator três (3), para o LOD, e pelo fator dez (10), para o LOQ (TALEUZZAMAN, 2018).

Uma vez preparado, mantido em condição refrigerada (4°C) e protegido da luz, a estabilidade do biossensor foi testada, armazenando-o nessas condições e verificando sua resposta após 48 h. Foi verificada variação relativamente baixa (CV = 6,5%) entre as respostas, e o protótipo apresentou estabilidade operacional de pelo menos 6 h de trabalho ininterruptas. Uma vez intumescido, o biossensor pode ser lavado com solução tampão K-PBS e reutilizado, levando cerca de 8 min para nova estabilização da corrente, a fim de se proceder novas medições. É importante a realização de um estudo mais amplo de estabilidade ao longo do tempo, pois acredita-se que o tempo de armazenamento pode ser ainda muito maior que 48h, desde que avaliadas e otimizadas as condições de estocagem do biossensor.

Um biossensor amperométrico foi desenvolvido para a pesquisa de plantas medicinais com potencial de prevenir quadros de hiperuricemia (EL HARRAD; AMINE, 2016). Eletrodos impressos modificados com PB foram empregados como sensor-base e a enzima xantina oxidase (1,0 mg mL⁻¹), usada como elemento de bioreconhecimento, foi imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho com o auxílio dos agentes nafion e

glutaraldeído. O biossensor construído, quando armazenado em solução tampão de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,5) a 4 °C, exibiu estabilidade durante 3 (três) semanas, mantendo o sinal amperométrico próximo a 90% de sua resposta inicial. No entanto, a partir da quarta semana, uma diminuição de 40% em relação a resposta inicial foi observada. Possivelmente, o biossensor aqui desenvolvido para determinação da capacidade antioxidante apresentará uma estabilidade superior a 3 (três) semanas quando avaliada sua estabilidade ao longo do tempo, tendo em vista o emprego do agente PVA-AWP estar sujeito a menores perdas da atividade enzimática quando comparado ao uso de glutaraldeído (BEESABATHUNI, 2010).

Piermarini *et al.* (2013) desenvolveram um biossensor para determinação de ácido úrico em 85 amostras de soro sanguíneo. Um eletrodo impresso modificado com PB, contendo a enzima uricase imobilizada com auxílio dos agentes nafion e glutaraldeído, foi acoplado a uma instrumentação portátil e utilizado nas análises cronoamperométricas. Os dados mostraram que cerca de 90% da atividade inicial permaneceu inalterada por 15 dias de armazenamento.

A determinação de compostos fenólicos em alimentos, empregando biossensores enzimáticos a base de lacase, tem sido amplamente estudada. Estes diferem em termos da carga enzimática e natureza da lacase (liofilizada ou em solução), do procedimento de imobilização, das características do eletrodo, da natureza da amostra (formulações farmacêuticas, extratos de plantas entre outros), do analito fenólico e do desempenho analítico final. Nesse cenário, observa-se a disparidade na estabilidade dos biossensores ao longo do tempo, variando de 10 (dez) a 320 (trezentos e vinte) dias (RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2015; DI FUSCO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2008). Sabe-se que para que enzima exiba atividade máxima e contribua para a estabilidade e a reutilização do biossensor, a seleção do método de imobilização enzimático deve considerar a natureza do elemento biológico, o tipo de transdutor utilizado, as propriedades físico-químicas do analito e as condições de operação nas quais o biossensor deve funcionar (RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2008).

A Figura 25 mostra a faixa de concentrações do substrato hipoxantina (HX) para as quais a resposta do biossensor mostrou-se linear ($R^2 = 0,997$). Observa-se que uma concentração de 10 µmol L⁻¹ resultou em uma corrente cuja intensidade é adequada para a detecção de pequenas variações de corrente que sinalizem a presença de antioxidantes, mesmo em pequenas quantidades.

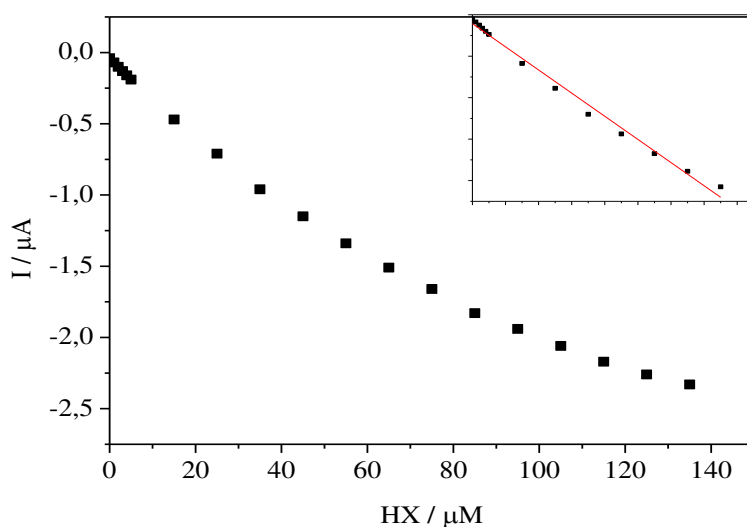


Figura 25 - Respostas cronoamperométricas do biossensor em diferentes concentrações do substrato hipoxantina (HX), destacando sua faixa linear ($1,0\text{-}75\ \mu\text{mol L}^{-1}$).

Para obter resultados confiáveis, muitas vezes um adequado controle de qualidade torna-se necessário, no decorrer dos ensaios cronoamperométricos. O uso de cartas de controle pode ser uma estratégia eficaz para garantir que não haja mudanças em um determinado processo ao longo do tempo. A Figura 26 mostra a carta de controle estatístico, construída para 10 (dez) medições de $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de HX, na ausência de antioxidantes.

Os dados do eixo-x equivalem às medições sequenciais, e os do eixo-y, as respostas cronoamperométricas obtidas sob idênticas condições. Percebe-se que o biossensor não sofreu alterações após repetidas medições, com variações mínimas ao redor da intensidade de corrente média (linha sólida central, de cor vermelha). O valor constante que compõe as duas linhas cheias, mais próximas à linha central, equivale à média das respostas ± 2 vezes o desvio padrão (limites superior e inferior de advertência). As linhas tracejadas, por sua vez, foram estabelecidas como a média das respostas ± 3 vezes o desvio padrão (limites superior e inferior de ação). Tais linhas foram estabelecidas de forma a se alertar para as irregularidades ocorridas no decorrer dos ensaios que levam a uma variabilidade das respostas. Quando dois ou mais resultados, em sequência, excederem uma das linhas de advertência, ou quando um único resultado exceder uma das linhas de ação, isso significa que o método pode ser considerado estatisticamente fora de controle (SUMAN; PRAJAPATI, 2018). Dentro dessas premissas básicas, conclui-se

que o biossensor desenvolvido apresenta elevado nível de confiabilidade e repetibilidade em relação às respostas que fornece.

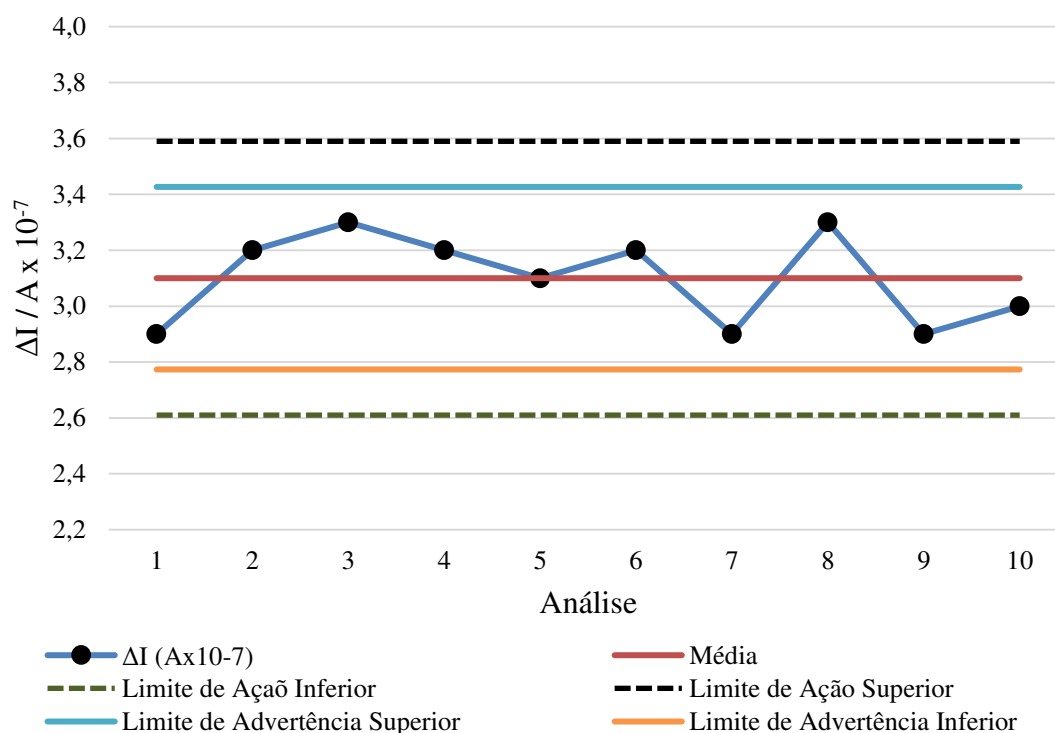


Figura 26 - Carta de controle estatístico para monitoramento e identificação de variações no decorrer dos ensaios cronoamperométricos com o mesmo biossensor (n=10).

O uso da carta auxilia a detectar variações fora do padrão, possibilitando corrigi-las. As cartas de controle devem ser revistas periodicamente para que seus limites de controle sejam ajustados de acordo com otimizações e a necessidade do processo.

Mundaca-Urbe *et al.* (2017) empregaram a abordagem das cartas de controle para avaliar a estabilidade do biossensor construído, para detecção de ácido málico em sucos de frutas, ao longo de 19 (dezenove) dias. Através da carta gerada, os autores observaram que as medidas eletroquímicas permaneceram dentro dos limites de advertência nos primeiros 17 (dezessete) dias, passando a cair gradualmente a resposta após este período.

Do mesmo modo, Oliveira *et al.* (2012) fizeram uso do gráfico de controle como ferramenta estatística para avaliar a estabilidade do biossensor enzimático idealizado para a determinação de glifosato em ambientes aquático. O gráfico de controle evidenciou a

eficiência da imobilização da peroxidase no eletrodo, com estabilidade do biossensor em um tempo máximo de 8 (oito) semanas de armazenamento sob temperatura controlada.

O biossensor desenvolvido neste trabalho apresentou bom desempenho com elevadas sensibilidade e precisão, além de rápido tempo de resposta e baixo custo de operação, uma vez que necessita de poucos reagentes e em pequenas concentrações, nas condições do ensaio. Apresenta ainda excelente estabilidade do sinal gerado, fácil automação para preparo em macroescala, simplicidades de operação e fabricação, além de utilizar um valor baixo de potencial aplicado, o que minimiza interferências eletroquímicas. No que tange à relevância biológica, o biossensor apresentou uma vantagem adicional, uma vez que mede a capacidade antioxidante combinada contra as EROs $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 que também são produzidas pelo corpo humano, ao invés de utilizar radicais artificiais, como é o caso dos ensaios colorimétricos convencionais, como ABTS e DPPH.

Outra grande vantagem do protótipo é a capacidade de portabilidade (desde que conectado ao potenciostato portátil), o que lhe confere atributos para a determinação da capacidade antioxidante *in situ*, de modo a prevenir perdas por degradação destes em função da luminosidade, da variação de temperatura e da presença de oxigênio. Esta pode ser uma ferramenta promissora para determinação da capacidade antioxidante em amostras ambientais, em poucos minutos, e sem necessitar de etapas laboriosas de preparo de amostras.

6.2.4 Aplicação do biossensor

6.2.4.1 Validação da resposta do biossensor pelo antioxidante ácido gálico

O biossensor desenvolvido foi primeiramente aplicado na determinação da capacidade antioxidante da substância pura ácido gálico. O ácido gálico é um antioxidante de referência, encontrado em vegetais, que possui elevada capacidade redutora, sendo por isso de grande interesse médico, farmacêutico e da tecnologia de alimentos (YEN; DUHB; TSAI, 2002).

As medidas amperométricas foram realizadas seguindo os protocolos detalhados na Seção 5.4.3. A diminuição da intensidade da corrente catódica em função da concentração de ácido gálico é apresentada na Figura 27. A capacidade antioxidante (%)

do ácido gálico, calculada pela expressão 6 para as diferentes concentrações, é apresentada na Figura 28.

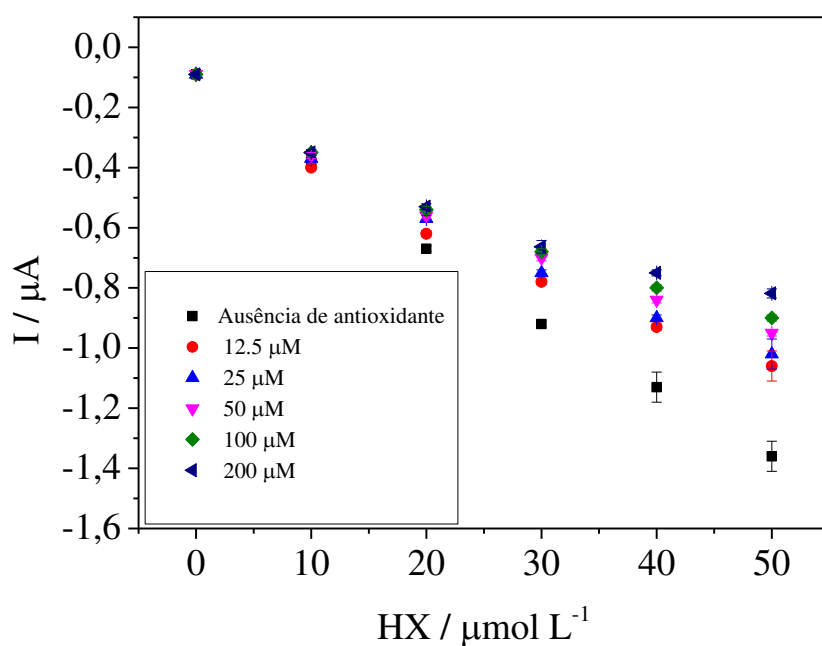


Figura 27 - Intensidade da corrente gerada no sistema biossensor, em função da concentração de HX adicionada, na ausência e presença do ácido gálico, em diferentes concentrações.

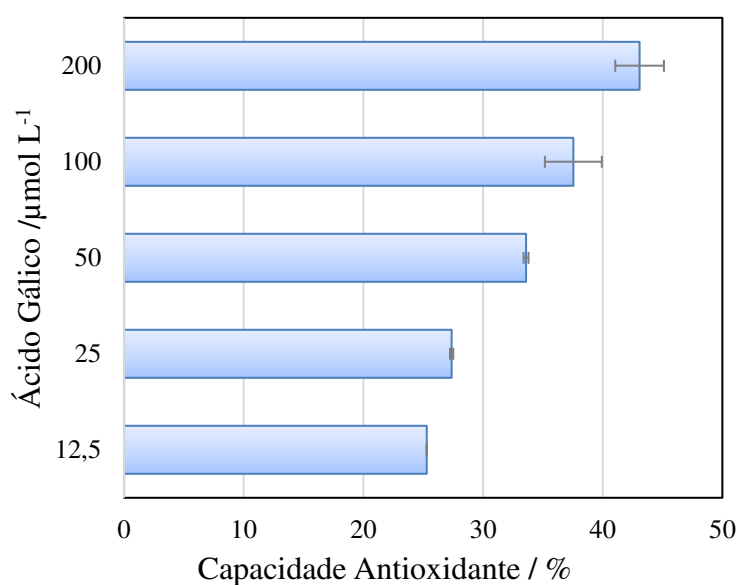


Figura 28 - Capacidade antioxidante do ácido gálico, em função da sua concentração, determinada pelo sistema biossensor.

As adições sucessivas de 20 μL de HX (5 mmol L^{-1}) na presença do ácido gálico em concentrações crescentes resultaram em uma diminuição do sinal eletroquímico, que foi proporcional à concentração do ácido gálico (Figura 23). As moléculas de ácido gálico, assim como as de outras espécies antioxidantes, podem reagir com o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , inibindo-os e induzindo uma diminuição na quantidade de H_2O_2 em solução. Isso provoca uma diminuição na corrente catódica que permite a quantificação da capacidade antioxidante.

Com esse experimento, foi possível verificar, com o sistema biossensor desenvolvido, uma forte correlação entre a redução da resposta cronoamperométrica e a concentração do antioxidante. Desta forma, aliando esse experimento com as figuras de mérito já discutidas (linearidade, sensibilidade, precisão, estabilidade), pode-se concluir que o biossensor proposto foi convenientemente validado para fins analíticos.

A fim de validar ensaios analíticos e bioanalíticos para determinação da capacidade antioxidante, tais como NBT, ORAC, ABTS e DPPH, diferentes substâncias puras antioxidantes têm sido empregadas, entre elas ácido gálico, ácido ascórbico, trolox e ácido úrico. Essas substâncias foram também utilizadas como referência no relatório técnico da IUPAC sobre os métodos de medição e avaliação de capacidade antioxidante (AKAK *et al.*, 2013). Trabalhos envolvendo o desenvolvimento de biossensores para a determinação da capacidade antioxidante têm empregado como antioxidantes de referência o ácido gálico (BARROSO; DELERUE-MATOS; OLIVEIRA, 2012), o trolox (CAMPANELLA *et al.*, 2013), o ácido ascórbico (BARROSO; DELERUE-MATOS; OLIVEIRA, 2012; LATES; MARTY; POPESCU, 2011), o ácido acetilsalicílico (CORTINA-PUIG *et al.* 2010), aliina (CORTINA-PUIG *et al.* 2009), o ácido cafeico, o ácido cumárico e o resveratrol (BARROSO; DELERUE-MATOS; OLIVEIRA, 2012). Entre os antioxidantes de referência, o uso do ácido gálico como referência para validação de ensaios que visam à determinação da capacidade antioxidante se destaca tanto pelo elevado potencial antioxidante, quanto pela eficiência como agente indutor de apoptose. Tais propriedades justificam as diversas atividades biológicas e farmacológicas inerentes a esta molécula trifenólica, e o seu interesse para aplicações clínicas e industriais (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

6.2.4.2 Determinação da capacidade antioxidante de amostras reais

O biossensor desenvolvido foi aplicado na determinação da capacidade antioxidante de polpas comerciais de frutos amazônicos (néctares na proporção polpa:tampão de 10:90, v/v) e de polpas *in natura* (refrescos na proporção polpa:tampão de 25:75, v/v) de frutos não autóctones. As medições amperométricas foram realizadas seguindo o protocolo detalhado na Seção 5.4.3. Nas figuras 29 e 30 são apresentadas as curvas obtidas da concentração do substrato enzimático HX em função da intensidade da corrente catódica observada na ausência de antioxidantes e na presença de néctares e refrescos dos frutos.

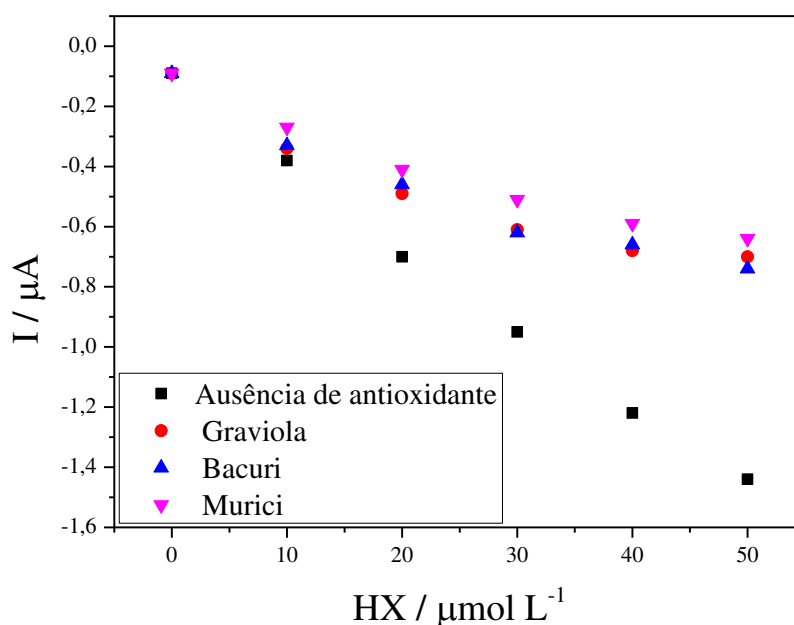


Figura 29 - Efeito antioxidante dos néctares de polpas comerciais de frutos amazônicos. Resposta do biossensor amperométrico em função de sucessivas adições do substrato hipoxantina (HX), na ausência e presença das amostras.

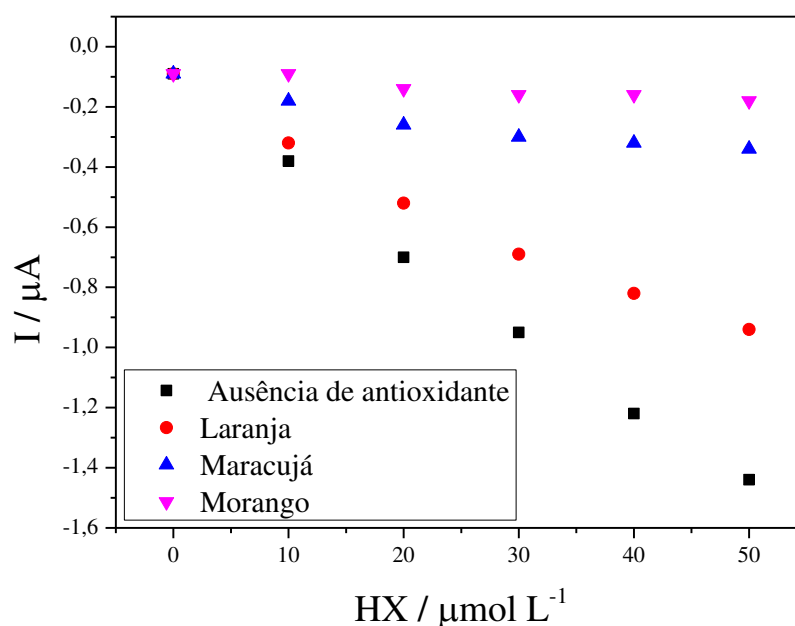


Figura 30 - Efeito antioxidante dos refrescos de frutos não autóctones. Resposta do biossensor amperométrico em função de sucessivas adições do substrato hipoxantina (HX), na ausência e presença das amostras.

Observando-se as Figuras 29 e 30, aparentemente a amostra de morango apresentou uma maior capacidade antioxidante, haja vista a maior inclinação da curva analítica quando comparada à do controle negativo (ensaio na ausência de antioxidante). No entanto, para que uma comparação entre estes resultados possa ser realizada, sem que as amostras de frutos amazônicos sejam subestimadas em sua capacidade antioxidante, é necessário avaliar as amostras para uma mesma quantidade de polpa ou suco. Neste sentido, uma aproximação foi realizada, considerando-se que na preparação dos refrescos (25% v/v) foram utilizados 2,5 vezes mais polpas de morango, maracujá e laranja do que para os frutos amazônicos graviola, bacuri e murici (néctares a 10 % v/v). Desse modo, foi necessário se dividir por 2,5 os valores da capacidade antioxidante obtida para os refrescos dos frutos não autóctones (Figura 32), e assim foi possível observar que os frutos amazônicos possuem um maior potencial antioxidante. Os frutos amazônicos, por serem nativos da região, possuem as adaptações necessárias para sobreviver no *habitat* e estão integrados aos ciclos biogeoquímicos presentes no meio; por este motivo, comumente o conteúdo nutricional desses frutos são superiores aos dos frutos domesticados (ODHAV *et al.*, 2007).

A literatura de referência mostra trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante de alguns frutos aqui contemplados (BECKER *et al.*, 2019; HIDALGO; ALMAJANO, 2017; BHAT; STAMMINGER, 2015). No entanto, os resultados obtidos são dificilmente comparáveis, devido aos diferentes mecanismos de reação, concentrações dos extratos, potenciais redox, valores de pH, tipos de solventes empregados, concentração de espécies radicais, bem como os tipos de ensaios aplicados (APAK *et al.*, 2013).

Em um trabalho anterior (BECKER *et al.*, 2019), extratos (preparados em solução tampão K-PBS) de morangos *in natura* produzidos na França tiveram suas capacidades antioxidantes determinadas empregando-se o ensaio colorimétrico NBT. Os extratos possuíam diferentes relações massa/tampão e o potencial antioxidante foi medido contra os radicais superóxidos produzidos pelo sistema enzimático HX/XOD. Comparando-se os resultados obtidos com o biossensor e o ensaio NBT (93,0 e 92,4 %, respectivamente), nota-se que não existem diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre estes. É importante salientar que os frutos eram provenientes de diferentes países e a concentração tomada para fins de comparação de 10 % deu-se em razão volumétrica para as amostras em massa úmida no biossensor, e em razão m/v para as amostras francesas liofilizadas. Apesar das diferenças apontadas, sabe-se da elevada capacidade antioxidante de frutos vermelhos como o morango, o que foi demonstrado em ambos os métodos através da inibição similar das EROs em mais de 90 % (HIDALGO; ALMAJANO, 2017).

Os resultados obtidos, agora expressos em capacidade antioxidante (%) das amostras de néctares e refrescos dos frutos são apresentados nas figuras 31 e 32, respectivamente.

As amostras de néctar dos frutos de bacuri, graviola e murici inibiram mais de 50% das EROs geradas *in vitro* e os resultados obtidos não diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$) (Figura 31). Do ponto de vista analítico, esses resultados podem ser considerados bastante interessantes, haja vista que foram observadas elevadas taxas de inibição, mesmo para as amostras diluídas, o que demonstra mais uma vez a elevada sensibilidade do biossensor enzimático proposto. Bacuri e graviola são frutos nativos brasileiros e murici é um fruto cultivado utilizado pela população local como alimento e na medicina popular, sendo consumido *in natura*, na forma de sucos, doces e sorvetes.

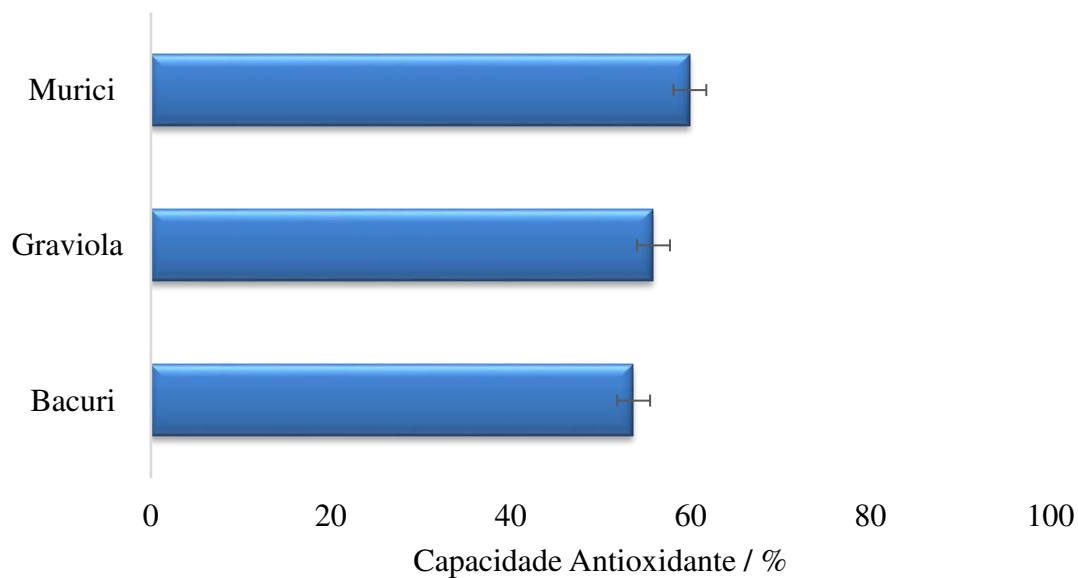


Figura 31 - Capacidade antioxidante dos néctares dos frutos amazônicos avaliados pelo biossensor desenvolvido.

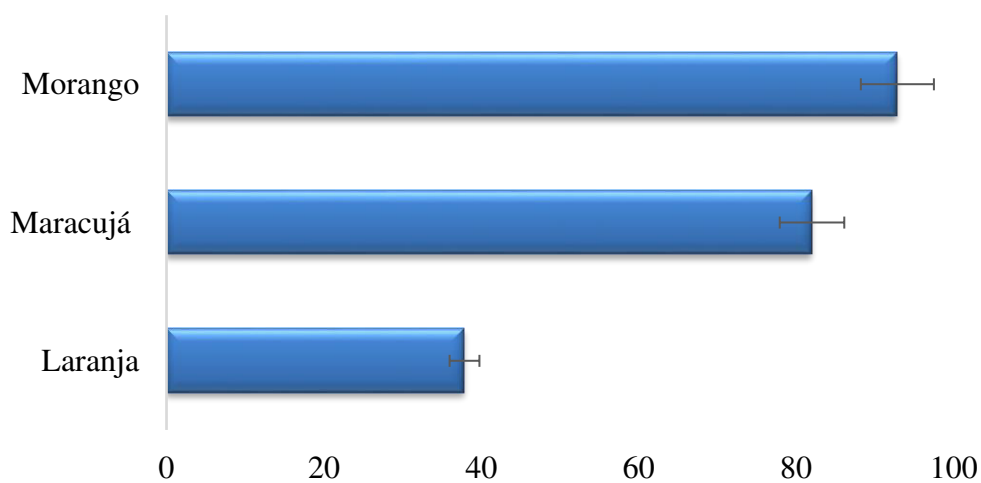


Figura 32 - Capacidade antioxidante dos refrescos dos frutos não autóctones avaliados pelo biossensor desenvolvido.

Comparando-se os resultados para os refrescos dos frutos de laranja, maracujá e morango (Figura 32), nota-se que a amostra de morango apresentou a maior capacidade antioxidante (93,0%), seguida das amostras de maracujá (82,0%) e laranja (37,9%).

O refresco de laranja, mesmo sendo preparado a partir do fruto *in natura*, no qual espera-se haver menores perdas relativas ao armazenamento, apresentou a menor

capacidade antioxidante, inclusive quando comparado aos néctares de polpas congeladas. Sabe-se que fatores como variedade da planta, diversidade genética, estágio de maturação, condições climáticas e edáficas, processamento e estocagem dos alimentos, entre outros, podem influenciar fortemente o teor de fitoquímicos (MELO *et al.*, 2008). Contudo, no presente trabalho, um biossensor altamente sensível e seletivo demonstrou que refrescos de laranja não apresentam elevado potencial antioxidante.

A capacidade antioxidante determinada pelo biossensor expressa o potencial sinérgico dos compostos químicos antioxidantes, presentes nas amostras, em inibir as EROs combinadas ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2). Devido à diversidade química de antioxidantes existentes em amostras reais como a laranja, não se pode deliberar com segurança o motivo pelo qual o néctar de laranja apresentou a menor capacidade antioxidante, visto serem necessárias a identificação e a quantificação de todos os compostos antioxidantes presentes nesta matriz. Sabe-se que a laranja é apreciada pelo seu elevado teor de vitamina C, um nutriente conhecido por suas propriedades antioxidantes naturais (VANNUCCHI; ROCHA, 2012). Por outro lado, trabalhos científicos têm apontado para o baixo conteúdo em compostos fenólicos neste fruto, os quais são considerados os maiores responsáveis pelas atividades antioxidantes em vegetais (ÁLVAREZ *et al.*, 2014). Logo, a composição química da laranja, possivelmente formada por menores teores em compostos fenólicos, contribuiu para o seu menor potencial antioxidante, resultado que corrobora com as afirmações de Riso *et al.* (2005).

Por fim, observa-se que uma prévia diluição das amostras no próprio tampão do ensaio é necessária quando se utiliza o biossensor. Em virtude da complexidade de matrizes ambientais, nem sempre uma mesma concentração para diferentes amostras poderá ser empregada, por isso podem ser necessárias diluições, sendo esta uma realidade de qualquer método bioanalítico.

Vale salientar, que a metodologia empregada para o preparo dos néctares e refrescos também tomou como base a inclusão desses frutos na alimentação da população em forma de bebidas, de modo a obter concentrações dos frutos próximas ao convencionalmente consumido (néctar e refresco). O uso de solução tampão como solvente na extração de analitos, bem como na diluição de amostras, têm sido uma estratégia utilizada em trabalhos envolvendo biossensores enzimáticos para as mais diversas matrizes, tais como alimentos infantis, frutos, vegetais, chás e amostras de água (CORTINA-PUIG *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2005; CAMPANELLA; BONANNI;

TOMASSETTI, 2003; NUNES *et al.*, 1999). Além de manter a atividade enzimática, a solução tampão pode refletir condições de pH e salinidade que se aproximam das fisiológicas *in vivo* e oferecer maior sensibilidade (CORTINA-PUIG *et al.*, 2009).

Outras maneiras de expressar os resultados podem ser utilizadas, tais como a massa equivalente de um antioxidante de referência por massa de amostra e a concentração necessária da amostra que resulte em uma inibição de 50% das EROs geradas (IC₅₀). Avaliando-se os biossensores desenvolvidos em outros trabalhos para esse fim, observa-se que, assim como no presente trabalho, a capacidade antioxidante tem sido representada pela inibição refletida na inclinação da curva analítica (sensibilidade) obtendo-se assim a capacidade antioxidante relativa (CAMPANELLA *et al.*, 2013; CAMPANELLA *et al.*, 2009; CAMPANELLA; BONANNI; TOMASSETTI, 2003; CAMPANELLA *et al.*, 2004a; CAMPANELLA *et al.*, 2004b; CAMPANELLA *et al.*, 2003). Mas também a capacidade antioxidante tem sido expressa como IC₅₀ (em g L⁻¹ ou µg mL⁻¹) (CORTINA-PUIG *et al.* 2009; CORTINA-PUIG *et al.* 2010) e como porcentagem (%), calculada a partir da diminuição relativa da corrente de pico registrada na ausência e presença de um antioxidante (LATES; MARTY; POPESCU, 2011).

É interessante também mencionar os custos de obtenção de um biossensor. Caso o laboratório possua uma máquina de serigrafia adequada, em placas de PVC de dimensões 10,5 x 20 cm, podem ser serigrafadas, de uma só vez, 24 sensores eletroquímicos (vide figuras B6 e B7 do Anexo B). Daí, após a modificação do eletrodo de trabalho de grafite, mediante incorporação do mediador, seguida da imobilização da enzima, o custo total de um único biossensor pode chegar a menos de dois dólares, haja vista que as quantidades de reagentes e pastas de grafite, Ag/AgCl e tinta são ínfimas. No decorrer do ensaio, devido aos pequenos volumes de soluções do tampão e do substrato HX, e considerando-se ainda a baixa concentração desta última, pode-se inferir que uma única aplicação teria o custo final de menos de três dólares. Desta forma, evidencia-se a viabilidade econômica e a grande aplicabilidade para o biossensor aqui desenvolvido, daí porque, antes mesmo da defesa da presente Tese, foi feito o depósito de uma patente de invenção referente ao protótipo, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI.

7. CONCLUSÕES

Apesar da biodiversidade vegetal, muitos frutos amazônicos ainda são pouco explorados quanto aos seus potenciais biotecnológicos. Neste estudo, dez frutos nativos que fazem parte da dieta dos habitantes da Amazônia foram avaliados quanto as suas propriedades nutricionais, antioxidantes, composição em bioativos, bem como sua citotoxicidade na linhagem celular de carcinoma do cólon humano. Além disso, um biossensor amperométrico para a determinação da capacidade antioxidante em amostras complexas como frutos foi desenvolvido, tendo em vista a necessidade de ferramentas de melhor eficiência analítica e relevância biológica.

Os resultados da análise bromatológica mostram a diversidade na composição físico-química dos frutos, em que maiores conteúdos de lipídeos, proteínas e energia foram obtidos nas amostras de buriti, monguba e uxi. Do ponto de vista nutricional, e com foco nas aplicações industriais, esses dados são bastante relevantes.

A avaliação da composição mineral dos frutos de abiu, açaí, bacuri, buriti, inajá, monguba, pajurá e uxi permitiu classificá-los como sendo de elevado teor e/ou fonte em um ou mais minerais (Mg, Cu, Fe e Mn) e, portanto, a inclusão destes frutos na dieta alimentar pode contribuir para correções nutricionais e prevenir enfermidades relacionadas a deficiências desses minerais. Os teores de Cu e Mn na polpa de inajá e Ca na polpa de pajurá foram reportados pela primeira vez neste estudo.

Em relação aos compostos bioativos, as polpas de açaí, bacuri, buriti, cupuaçu, inajá e uxi foram classificadas como alimentos de alto teor em vitamina C, enquanto os frutos de biribá e pajurá mostraram ser fontes nesse nutriente. Este trabalho foi o primeiro a apresentar a concentração de vitamina C nos frutos de inajá, monguba e pajurá.

Todos os frutos apresentaram capacidade antioxidante contra diferentes fontes oxidantes, no entanto, as polpas de biribá e bacuri mereceram destaque por apresentarem maior capacidade antioxidante lipofílica, enquanto os frutos de abiu, inajá e monguba por possuírem maior capacidade antioxidante hidrofílica.

As concentrações crescentes dos extratos dos frutos amazônicos levaram a uma inibição no crescimento da linhagem celular de caco-2. O presente trabalho foi o primeiro a mostrar os efeitos antiproliferativos de grande parte dos frutos estudados, sendo que a continuação desse estudos pode direcionar a estratégias terapêuticas.

O perfil cromatográfico qualitativo em compostos fenólicos revelou uma ampla diversidade destes, em que 38 compostos puderam ser identificados. A quantificação destes nos frutos de biribá, inajá e monguba permitiu a determinação de 11, 25 e 21 compostos fenólicos, respectivamente, entre eles ácidos fenólicos, flavonóides e estilbenos com atividades biológicas importantes, tais como efeitos benéficos sobre a doença de Parkinson, Alzheimer, obesidade, diabetes e inibição da proliferação de algumas formas de câncer.

Nesse trabalho, foi também desenvolvida uma nova ferramenta analítica: um biossensor enzimático capaz de determinar a capacidade antioxidante de amostras vegetais naturais ou processadas. As condições de biofuncionalização foram otimizadas por modelagem quimiométrica, sua performance analítica caracterizada, e, por fim, o protótipo foi empregado na determinação da capacidade antioxidante de substâncias antioxidantes puras e amostras reais de frutos.

A imobilização da enzima XOD usando PVA-AWP mostrou-se uma excelente estratégia para a biofuncionalização do eletrodo na construção do biossensor, tendo sido otimizadas, quimiometricamente, as condições operacionais que levassem à redução de interferências eletroquímicas e em maior sensibilidade e precisão, bem como na economia de tempo e de quantidades de reagentes. O protótipo mostrou também simplicidade na construção e operação, baixo custo, estabilidade do sinal gerado, fácil automação, bom período de operação contínuo e reutilização, além de elevada capacidade de portabilidade.

Destaca-se ainda a relevância biológica desta ferramenta frente os ensaios colorimétricos convencionais, uma vez que, mediante uso do biossensor, determina-se a capacidade antioxidante de amostras contra as EROs combinadas ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2), as quais estão presentes em sistemas biológicos e apresentam citotoxicidade em condições de estresse oxidativo. Os parâmetros bioeletroanalíticos, aliados à simplicidade na sua construção, torna o biossensor proposto uma ferramenta promissora para a determinação da capacidade antioxidante em amostras vegetais, naturais ou processadas.

REFERÊNCIAS

ADHOUM, N.; MONSER, L. Electrochemical sensor for hydroperoxides determination based on Prussian blue film modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, n. 2, p. 588-592, 2008.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-40, 2007.

AGUIAR, G. F. de S. Nutrição e adaptação humana em áreas de pesca na Amazônia: sugestões para políticas em saúde. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, vol. 1, n. 2, p. 129-138, 2006a.

AGUIAR, L. P. **Qualidade e potencial de utilização de bacuris oriundos da região meio-norte**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006b.

AKRAM, S.; AMIR, R. M.; NADEEM, M.; SATTAR, M. U.; FAIZ, F. Antioxidant potential of black tea (*Camellia sinensis* L.) e a review. **Pakistan Journal of Food Sciences**, v. 22, n. 3, p. 128-132, 2012.

ALBANESE, D.; SANNINI, A.; MALVANO, F.; PILLOTON, R.; MATTEO, M. D. Optimisation of glucose biosensors based on sol-gel entrapment and Prussian blue-modified screen-printed electrodes for real food analysis. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1002-1008, 2014.

ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. Electrochemical Sensor Analysis. *In*: Alegret and Merkoçi (Eds). **Comprehensive Analytical Chemistry**, Elsevier B., v. 49, p. 143-161, 2007.

ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. **Journal of nutrition and metabolism**. 569486, 2012.

ALJOVIĆ, I.; GOJAK-SALIMOVIĆ, S. Evaluation of the antioxidant activity of ferulic, homovanillic and vanillic acids using the Briggs-Rauscher oscillating reaction method. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina**, v. 49, p. 35-38, 2017.

ÁLVAREZ, J.; PASTORIZA, S.; ALONSO-OLALLA, R.; DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÁN-HENARES, J. A.. Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. **Food Chemistry**, v. 164, p. 396, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Erna Regina Reetz ...[et al.]. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2015.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Determination of Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods. Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion. AOAC, Official Methods. 999.10. AOAC, Rockville, MD, 2002.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis, 16 ed, 3^a rev, Gaithersburg: Published by AOAC International, v. 2, n. 32, p. 1-43, 1997.

APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K. M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.

AQUINO, A. C. de. **Eficiência da maceração enzimática da polpa de bacuri (*Platonia insignis* Mart)**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ARAGÃO, A. B. **Caracterização bioquímica e centesimal das espécies *Astrocaryum vulgare* Mart. (tucumã) e *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (uxi) nativas da região amazônica**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ARATHI, B. P.; SOWMYA, P. R-R.; VIJAY, K.; BASKARAN, V.; LAKSHMINARAYANA, R. Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 105-117, 2015.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2001.

ARTS, I. C. W.; PUTTE, B. V.; HOLLMAN, P. C. H. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1746-1751, 2000.

AZEVEDO, C. C. de. **Modificação química das proteínas de amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl): propriedades funcionais**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 35, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BALMUS, I. M.; CIOBICA, A.; TRIFAN, A.; STANCIU, C. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 22, p. 3-17, 2016.

BANERJEE, S.; SARKAR, P.; TURNER, A. P. F. Amperometric biosensor based on Prussian Blue nanoparticle-modified screen-printed electrode for estimation of glucose-6-phosphate. **Analytical Biochemistry**, v. 439, p. 194-200, 2013.

BARBOSA, M. O. **Bioativos em sementes de sete espécies não convencionais ocorrentes no Brasil**. 2016. 90 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Biologia Vegetal, Recife, 2016.

BARBOSA, S.; PARDO-MATES, N.; HIDALGO-SERRANO, M.; SAURINA, J.; PUIGNOU, L.; NÚÑEZ, O. Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 9353–9365, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; BARREIROS, M. L. Atividade antioxidante das frutas amazônicas abiu (*Pouteria caimito*), biribá (*Rollinia mucosa*) e cubiu (*Solanum sessiliflorum*) pelo método do seqüestro do DPPH. In: 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Anais [...]** 2011.

BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, 2012.

BECKER, M. M.; RIBEIRO, D. B.; SILVA, F. E. P. S.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. NUNES, G. S. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2019.

BEESEBATHUNI, S. N. **Evaluation of Immobilizing Horseradish Peroxidase and Alcohol Oxidase in PVA-AWP Polymer**. 2010. 75 f. Tese (Master of Science thesis) - University of Illinois at Urbana Champaign, Illinois, 2010.

BERTO, A., RIBEIRO, A. B., SENTANDREU, E., DE SOUZA, N. E., MERCADANTE, A. Z., CHIST, R. C., FERNANDES, E. The seed of the Amazonian fruit *Couepia bracteosa* exhibits higher scavenging capacity against ROS and RNS than its shell and pulp extracts. **Food Function**, v. 6, n. 9, p. 3081, 2015b

BERTO, A., SILVA, A. F. DA S., VISENTAINER, J. V., MATSUSHITA, M., DE SOUZA, N. E. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, v. 77, p. 441–449, 2015a.

BEZERRA, V. S. O Inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) como fonte alimentar e oleaginosa. **Comunicado técnico 129**. EMBRAPA. Macapá, 2011.

BEZERRA, V. S.; FERREIRA, L. A. M.; PEREIRA, S. S. C.; CARIM, M. de J. V. O inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) como potencial alimentar e oleaginoso, 3, 2006, Varginha. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL. **Anais** [...]. Varginha: UFLA, 2006. p. 301-305.

BHAT, R.; STAMMINGER, R. Impact of ultraviolet radiation treatments on the physicochemical properties, antioxidants, enzyme activity and microbial load in freshly prepared hand pressed strawberry juice. **Food Science and Technology International**, v. 21, p. 354-363, 2015.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal disease. **Physiological Reviews**, v. 94, p. 329-354, 2014.

BIASEBETTI, M. B. C.; RODRIGUES, I. D.; MAZUR, C. E. Relação do consumo de vitaminas e minerais com o sistema imunitário: uma breve revisão. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, p. 130-136, 2018.

BIRNBOIM, H. C. DNA Strand Breaks in Human Leukocytes Induced by Superoxide Anion, Hydrogen Peroxide and Tumor Promoters are Repaired Slowly Compared to Breaks Induced by Ionizing Radiation. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 1511-1517, 1986.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 48, 2014.

BOFFI, A.; FAVERO, G.; FEDERICO, R.; MACONE, A.; ANTIOCHIA, R.; TORTOLINI, C.; SANZÓ, G.; MAZZEI, F. Amine oxidase-based biosensors for spermine and spermidine determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1131-1137, 2015.

BOLZAN, R. C. **Bromatologia**, Frederico Westphalen: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Agrícola de Frederico Westphalen, 2013.

BOND, A. M.; CANTERFORD, D. R. Interference of lithium in atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 134-135, 1971.

BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A. C. O. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC ESIMS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 42/2010. Perfil Nutricional dos Alimentos Processados**. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 12 de 10 de setembro de 1999. Norma que estabelece os padrões de identidade e qualidade mínimos que deverão obedecer a polpa de açaí e o açaí, destinados ao consumo como bebida**. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/PIQ_ACAI_000gbz55aph02wx5ok01dx9lc1b3wlho.pdf. Acesso em: 10 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 27 de 13 de jan. 1998. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar**. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. 2011. Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br>. Acesso em: 10 nov. 2018.

CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; BELLANTONI, D.; TOMASSETTI, D. Biosensors for determination of total antioxidant capacity of phytotherapeutic integrators: comparison with other spectrophotometric, fluorimetric and voltammetric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, 303-320, 2004a.

CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; FAVERO, G.; TOMASSETTI, M. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 1011-1016, 2003.

CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; FINOTTI, E.; TOMASSETTI, M. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 19, p. 641-651, 2004b.

CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; TOMASSETTI, M. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 725-736, 2003.

CAMPANELLA, L.; FAVERO G.; PERSI, L.; TOMASSETTI, M. Evaluation of radical scavenging properties of several plants, fresh or from a herbalist's, using a superoxide dismutase biosensor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 1055-1064, 2001.

CAMPANELLA, L.; GABBIANELLI, R.; GATTA, T.; MAZZONE, E.; TOMASSETTI, M. A. Superoxide dismutase biosensor for measuring the antioxidant capacity of blueberry based integrators. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 2, p. 208-216, 2013.

CAMPANELLA, L.; GATTA, T.; GREGORI, E.; TOMASSETTI, M. Determination of antioxidant capacity of papaya fruit and papaya-based food and drug integrators, using a biosensor device and other analytical methods. **Monatshefte für Chemie**, v. 140, p. 965-972, 2009.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. de T. Physical and chemical characterization of fruit pulps from amazonia and their correlation to free radical scavenger activity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1196-1205, 2010.

CARNEIRO, T. B.; CARNEIRO, J. G. de M. Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): aspectos físicos, químicos e tecnológicos. **Revista Verde**, v.6, n.2, p. 105-111, 2011.

CASTRO, C. F. S.; SILVA, C. A. M.; PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Anais** [...]. Águas de Lindóia, 2006.

CATANANTE, G.; ESPIN, L.; MARTY, J. L. Sensitive biosensor based on recombinant PP1 α for microcystin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 700-707, 2015.

CERRETANI, L.; BENDINI, A. Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. In: **Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**, OXFORD, Academic Press, 2010, p. 625-635.

CETTO, A. A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 325-348, 2005.

CHENG, L-Y.; LIAO, H-R.; CHEN, L-X.; WANG, S-W.; KUO, Y-H.; CHUNG, M-I.; CHEN, J-J. Naphthofuranone derivatives and other constituents from *Pachira aquatica*

with inhibitory activity on superoxide anion generation by neutrophils. **Fitoterapia**, v. 117, p. 16-21, 2017.

CHIU, J.-Y.; YU, C.-M.; YEN, M.-J.; CHEN, L.-C. Glucose sensing electrodes based on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/Prussian blue bilayer and multi-walled carbon nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, 2009, 24, 2015–2020.

COLINA, J.; GUERRA, M.; GUILARTE, D.; ALVARADO, C. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bebidas elaboradas con panela. **Archivos Latinoamericanos De Nutrición**, v. 62, n. 3, p. 303-310, 2012.

CONCHA, G.; BROBERG, K.; GRANDÉR, M. High-level exposure to lithium, boron, cesium, and arsenic via drinking water in the Andes of northern Argentina. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 17, p. 6875-6880, 2010.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. **Imprensa Nacional**, v. 6, 1984.

CORTINA-PUIG, M.; SCANGAS, A. C. H.; MARCHESE, Z. S.; ANDREESCU, S.; CALAS-BLANCHARD, C.; MARTY, J. L. Development of a Xanthine Oxidase Modified Amperometric Electrode for the Determination of the Antioxidant Capacity. **Electroanalysis**, v. 22, n. 20, p. 2429-2433, 2010.

CORTINA-PUIG, M.; MUÑOZ-BERBEL, X.; ROUILLON, R.; CALAS-BLANCHARD, C.; MARTY, J. L. Development of a cytochrome c-based screen-printed biosensor for the determination of the antioxidant capacity of orange juices. **Bioelectrochemistry**, v. 76, p. 76-80, 2009.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; DE LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; Melo Cavalcante, A. A. C.; Freitas, R. M.; Moura Sperotto, A. R.; Péres, V. F.; Moura, D. J.; Saffi, J. Investigation of biological activities of dichloromethane and ethyl acetate fractions of *Platonia insignis* Mart. seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, p. 34-41, 2013.

COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; TOMÉ, A. R.; CITÓ, A. M. G. L.; SAFFI, J.; FREITAS, R. M. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, p. 678-684, 2011.

COSTA, C. A.; OLIVEIRA, P. R.; BEM, G. F.; CAVALHO, L. C.; OGNIBENE, D. T.; SILVA, A. F.; VALENÇA, S. S.; PIRES, K. M.; SOUSA, P. J. C.; MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199-1209, 2012.

COSTA, J. P. C.; MÜLLER, C. H. **Fruticultura tropical: o biribazeiro (*Rollinia mucosa* Jacq.)** Baill. Belém: EMBRAPA-CPATU, p. 35, 1995.

- CUNNIFF, P. A. Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.). Association 384 of Official Analytical Chemist, 1998.
- DAL, S.; SIGRIST, S. The Protective Effect of Antioxidants Consumption on Diabetes and Vascular Complications. **Diseases**, v. 4, n. 24, p. 1-51, 2016.
- DEMIRDOVEN, A.; KARABIYIKLI, S.; TOKATLI, K.; ONCUL, N. Inhibitory effects of red cabbage and sour cherry pomace anthocyanin extracts on food borne pathogens and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63, p. 8-13, 2015.
- DI FUSCO, M.; TORTOLINI, C.; DERIUA, D.; MAZZEI, F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta**, v. 81, p. 235–240, 2010.
- DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; WILLIAMS, C. B. Recent advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 7, p. 1283-1296, 2017.
- DU, G. J.; ZHANG, Z.; WEN, X. D.; YU, C.; CALWAY, T.; YUAN, C. S.; WANG, C. Z. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. **Nutrients**, v. 4 1679-1691, 2012.
- DUARTE, O. R. **Avaliação quantitativa e análise dos parâmetros biológicos, químicos e físico-químicos de frutos de *Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude (Inajá) como subsídio ao estudo do potencial oleífero de populações promissoras para o Estado de Roraima**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- DZIAŁO, M.; MIERZIAK, J.; KORZUN, U.; PREISNER, M.; SZOPA, J.; KULMA, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, n. 160, p. 1-41, 2016.
- ECHEVERRI, J. A.; ROMÁN-JITDUTJAANO, O. E. Witoto ash salts from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 492–502, 2011
- EL HARRAD, L.; AMINE, A. Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 85, p. 57-63, 2016.
- EL-MOGHAZY, A. Y.; SOLIMAN, E. A.; IBRAHIM, H. Z.; NOGUER, T.; MARTY, J. L.; ISTAMBOULIE, G. Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly (vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil. **Food Chemistry**, v. 203, p. 73-78, 2016.
- ESPINOZA, M. A.; ISTAMBOULIE, G.; CHIRA, A.; NOGUER, T.; STOYTCHIEVA M.; MARTY, J. L. Detection of glycoalkaloids using disposable biosensors based on genetically modified enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 457, p. 85-90, 2014.

- FALCÃO, M. A.; CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do abiu (*Pouteria caimito*) na amazônia central. **Acta Amazônica**, v. 29, n. 1, p. 3-11, 1999.
- FALCÃO, M. A.; LLERAS, E.; KERR, W. E. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do Pajurá (*Couepia bracteosa* Benth). **Acta Amazônica**, v. 11, p. 473-482, 1981.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. Food and Fruit-bearing Forest Species: Examples from Latin America. Forestry paper 44/3, Rome, 1986.
- FAQUIN, V. **Nutrição mineral de Plantas**. Monografia (Especialização em Solos e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.
- FERNANDES, S. C.; DE OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 202-207, 2008.
- FERNÁNDEZ, I. M.; MOZOMBITE, D. M. S.; SANTOS, R. C.; MELO FILHO, A. A.; RIBEIRO, P. R. E.; CHAGAS, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; MELO, A. C. G. L.; MALDONADO, S. A. S. Oil in Inajá Pulp (*Maximiliana maripa*): Fatty Acid Profile and Anti-acetylcholinesterase Activity. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 80-83, 2016.
- FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191-206, 2009.
- FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; RIBEIRO, D. A.; BARBISAN, L. F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 68-76, 2013.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**, 9ª ed, São Paulo: Atheneu, 2005.
- FREIRE, J. A. P.; BARROS, K. B. N. T.; LIMA, L. K. F.; MARTINS, J. M.; ARAUJO, Y. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; AQUINO, J. S.; FERREIRA, P. M. P. Phytochemistry Profile, Nutritional Properties and Pharmacological Activities of *Mauritia flexuosa*. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 11, p. R2611-R2622, 2016.
- FUENTES, E.; RODRIGUEZ-PÉREZ, W.; GUZMÁN, L.; ALARCÓN, M.; NAVARRETE, S.; FORERO-DORIA, O.; PALOMÓ I. *Mauritia flexuosa* presents in vitro and in vivo antiplatelet and antithrombotic activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 65, p. 3257-3268, 2013.

GALE, A. M.; KAUR, R.; BAKER, W. L. Hemodynamic and electrocardiographic effects of acai berry in healthy volunteers: a randomized controlled trial. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 2, p. 421-423, 2014.

GALLAHER, D. D.; TRUDO, S. P. Nutrition and colon cancer. *In*: Coulston, A. M.; Boushey, C. J.; Ferruzzi, M., editors. **Nutrition in prevention and treatment of disease**. London: Academic Press, 2013, p. 697-715.

GARCIA, L. F.; BENJAMIN, S. R.; MARRETO, R. N.; LOPES, F. M.; GOLVEIA, J. C. S.; FERNANDES, N. C.; SANTIAGO, M. F.; GIL, E. S. Laccase Carbon Paste Based Biosensors for Antioxidant Capacity. The Effect of Different Modifiers. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 5650-5660, 2015.

GARCÍA-LOMILLO, J.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Total antioxidant capacity of decaffeinated beverages. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 25, n. 2, p. 43-46, 2014.

GHOSH, S.; PRASANNA, V. L.; SOWJANYA, B.; SRIVANI, P.; ALAGARAJA, M.; BANJI, D. Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy: A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 24-33, 2013.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.38, p. 232-242, 2003.

GOMES, S. A. S. S.; NOGUEIRA, J. M. F.; REBELO, M. J. F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1211-1216, 2004.

GOMES, S. M.C.; GHICA, M. E.; RODRIGUES, I. A.; GIL, E. S.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Flavonoids electrochemical detection in fruit extracts and total antioxidant capacity evaluation. **Talanta**, v. 154, p. 284–291, 2016.

GONÇALVES, A. E. de S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and 95 Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666-4674, 2010.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpa de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. C.; TAXI, C. D.; DONANGELO, C. M.; MATTIETTO, R. A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V. M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai frutis (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p. 256-263, 2012.

GOUDA, M. D. **Studies on immobilized enzymes for biosensor applications**. University of Mysore. 2000. 132 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Department of

Fermentation Technology and Bioengineering, Central Food Technological Research Institute, India, 2000.

HAGHIGHI, B., VARMA, S., ALIZADEH, SH.F.M., YIGZAW, Y., GORTON, L. Prussian Blue modified glassy carbon electrodes: study on operational stability and its application as a sucrose biosensor. **Talanta**, v. 64, p. 3-12, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O. O.; USMAN, L. A.; AMEEN, O. M.; LAWAL, A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 142-151, 2010.

HAO, Y.; GAO, R.; LIU, D.; HE, G.; TANG, Y.; GUO, Z. Selective Extraction and Determination of Chlorogenic Acid in Fruit Juices Using Hydrophilic Magnetic Imprinted Nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 200, p. 215-222, 2016.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, v. 73, p. 153-161, 2001.

HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 10432-10453, 2014.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑI, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v. 44, p. 1182-1189, 2011.

HIDALGO, G-I.; ALMAJANO, M. P. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 7, p. 1-27, 2017.

HIGUCHI, M, I, G.; HIGUCHI, N. **A Floresta Amazônica e suas múltiplas dimensões: uma proposta de educação ambiental**. Manaus: INPA; Brasília: CNPq. 2004.

HIRST, N. A.; HAZELWOOD, L. D.; JAYNE, D. G.; MILLNER, P. A. An amperometric lactate biosensor using H₂O₂ reduction via a Prussian Blue impregnated poly(ethyleneimine) surface on screen printed carbon electrodes to detect anastomotic leak and sepsis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 186, p. 674-680, 2013.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9/10, p. 937-942, 1999.

IAL. NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4ª ed., 1ª ed. Digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Ecossistemas. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 05 ago. 2016.

INBATHAMIZH, L.; PADMINI, E. Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer - a comparative pharmacokinetic approach. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 106-112, 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes**: The essential guide to nutrient requirements. Washington, D.C.: The National Academy Press, 2006.

INZELT G. Pseudo-reference Electrodes. *In*: Inzelt G., Lewenstam A., Scholz F. (eds) **Handbook of Reference Electrodes**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013.

ITAYA, K., ATAKA, T.; TOSHIMA, S. Spectroelectrochemistry and Electrochemical Preparation Method of Prussian Blue Modified Electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 4767-4772, 1982.

JAHNEN-DECHENT, W.; KETTELER M. Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, n. 1, p. i3-i14, 2012.

JAIN, P.; PAREEK, A.; RATAN, Y.; SHARMA, S.; PALIWAL, S. Free radicals and dietary antioxidants: a potential review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 18, n. 1, p. 34-48, 2013.

JIANG, D.; CHU, Z.; PENG, J.; JIN, W. Screen-printed biosensor chips with Prussian blue nanocubes for the detection of physiological analytes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 228, p. 679-687, 2016.

JIMÉNEZ, C. I. E.; MARTÍNEZ, E. Y. C.; FONSECA, J. G. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. **Revista de Faculdade de Medicina**, v. 52, n. 2, p. 73-75, 2009.

JIMÉNEZ, S.; GASCÓN, S.; LUQUIN, A.; LAGUNA, M.; ANCIN-AZPILICUETA, C.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M. J. Rosa canina Extracts Have Antiproliferative and

Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-14, 2016.

KAHL, V. F. S.; REYES, J. M.; SARMENTO, M. S.; SILVA, J. Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine in mice, assessed by the comet assay and micronucleus induction. **Mutation Research**, v. 744, p. 140-144, 2012.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, p. 153-161, 2002.

KHODADE, V. S.; CHANDRA, M. S.; BANERJEE, A.; LAHIRI, S.; PULIPETA, M.; RANGARAJAN, R.; HARINATH, C. Bioeductively Activated Reactive Oxygen Species (ROS) Generators as MRSA Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 777-781, 2014.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, 2008.

KOCZKA, N.; OMBÓDI, A.; MÓCZÁR, Z.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E. Total phenolic content and antioxidant capacity of ginkgo teas. **Acta Alimentaria**, v. 45, n. 1, p. 77-84, 2016.

KONTOS, H. A.; WEI, E. P. Superoxide Production in Experimental Brain Injury. **Journal of Neurosurgery**, 64, p. 803-807, 1986.

KOOLEN, H. H.; DA SILVA, F. M.; GOZZO, F. F.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473, 2013.

KOZLOWSKA, A.; SZOTASK-WEGIEREK, D. Flavonoids - food source and health benefits. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 65, p. 79-85, 2014.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of reactive oxygen species, in: S. Nonell, C. Flors (Eds.), Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, **Royal Society of Chemistry**, p. 3-21, 2016.

LABBULLETIN. Thermo Fisher Scientific UHPLC/MS Identifies Cannabinoids in Baked Goods with Minimal Sample Preparation. Disponível em: <https://www.labbulletin.com/articles/Thermo-Fisher-Scientific-UHPLC-MS-Identifies-Cannabinoids-in-Baked-Goods-with-Minimal-Sample-Preparation>. Acesso em: 4 jan. 2019.

LATES, V.; MARTY, J. L.; POPESCU, I. C. Determination of Antioxidant Capacity by Using Xanthine Oxidase Bioreactor Coupled with Flow-through H₂O₂ Amperometric Biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 3, p. 728-736, 2011.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M.; Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v. 95, p. 644-652, 2006.

LI, M.; LI, Y.-T.; LI, D.-W.; LONG, Y.-T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 31-44, 2012.

LI, A.-N.; LI, S.; ZHANG, Y.-J.; XU, X.-R.; CHEN, Y.-M.; LI, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047, 2014.

LIM, T. K. **Abiu-Pouteria Caimito**. Sub-Tropical Fruit Club of Queensland. Department of Primary Industry and Fisheries (DPIF), Northern Territory Government. 2006.

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 692-702, 2012.

LIU, R. H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. **Advances in Nutrition**, v. 4, p. 348S-392S, 2013.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 672, 2006.

LOVE, K.; PAULL, R. E. **Rollinia**. Publication F_N-21. Mānoa, Honolulu: College of Tropical Agriculture and Human Resources, 2011.

LÜ, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUCCI, P.; SAURINA, J.; NÚÑEZ, O. Trends in LC-MS and LCHRMS analysis and characterization of polyphenols in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1-24, 2017

LUDI, A.; GÜDEL, H. U. Structural Chemistry of Polynuclear Transition Metal Cyanides. **Structure and Bonding**, v. 14, p. 1-21, 1973.

LUKASKI, H. C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. **Nutrition**, v. 20, p. 632-44, 2004.

- MAILLOUX, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **RedoxBiology**, v. 4, p. 381-398, 2015.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980.
- MALTA, L. G.; GHIRALDINI, F. G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, L. B.; PASTORE, G. M. In Vivo Analysis of Antigenotoxic and Antimutagenic Properties of Two Brazilian Cerrado Fruits and the Identification of Phenolic Phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604-611, 2012.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MANDAVE, P. C.; PAWAR, P. K.; RANJEKAR, P. K.; MANTRI, N.; KUVALEKAR, A. A. Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 124-134, 2014.
- MANDELBAUM-SCHIMID, J. Vitamin and mineral deficiencies harm one-third of the World population. **World Health Organization**, v. 82, n. 3, p. 230-231, 2004.
- MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal e de compostos bioativos em frutos de buriti coletados no Pará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 856-863, 2011.
- MANICA, I. Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-Rio grande, jabuticaba. **Cinco Continentes**, v. 327, 2000.
- MANOCHAI, B.; INGKASUPART, P.; LEE, S. H.; HONG, J. H. Evaluation of antioxidant activities, total phenolic content (TPC), and total catechin content (TCC) of 10 sugar apple (*Annona squamosa* L.) cultivar peels grown in Thailand. **Food Science and Technology**, Campinas, Ahead of Print, 2018.
- MARIN, A. M. F. Potencial nutritivo de frutos do cerrado: composição em minerais e componentes não convencionais. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2006.
- MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, p. 11-24, 2011.
- MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799. 2008.

- MARSHALL, T. M. Lithium as a Nutrient. **Journal of American Physicians and Surgeons**, v. 20, n. 4, p. 105-109, 2015.
- MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.
- MARTINS, I.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. **Cadernos de referência ambiental**. Salvador: CRA. v. 7. 2001.
- MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. das G. B.; MALA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Parto 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Foods Research Technology**, v. 214, p. 331-334, 2002.
- MASSAROLLI, A.; PEREIRA, M. J. B.; FOERSTER, L. A. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A Promising Phytoinsecticide for the Control of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology**, v. 13, n. 4, p. 132-140, 2016.
- MASSING, L. T.; MOURÃO, R. H. V.; BOUILLET, L. E. M.; BERNARDES, R. S. A.; ANDRADE, E. H. A.; TREMEA, T.; SOUZA, J. N. S.; MAIA, J. G. S. Nutritional composition of the pulp of Pajurá (*Couepia bracteosa* Benth.), an underutilized fruit from the Amazon. **Integrative Food, Nutrition and Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2018.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; ARAÚJO, C. R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 67-72, 2008.
- MERRILL, A. L.; WATT, B. K. Energy value of foods: Basis and derivation. Revised. **Agriculture Handbook**, v. 74, p. 105, 1973.
- MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.
- MILANIA, J. M.; AMUZADEHB, A.; MOETAMEDZADEGAN, A. Effect of Different Additives on Antioxidant Capacity of Black Tea. **Journal of Culinary Science & Technology**, 2018.
- MINIOTIA, K. S.; GEORGIU, C. A. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. **Grasas y Aceites**, v. 61, n. 1, p. 45-51, 2010.
- MIRANDA, I. P. de A. *et al.* **Frutos de palmeiras da Amazônia**. Manaus: INPA, 2001.

MISRA, S.; FROELICH, P. N. Measurement of lithium isotope ratios by quadrupole-ICP-MS: application to seawater and natural carbonates. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 11, p. 1524-1533, 2009.

MISHRA, R. K.; ALONSO, G. A.; ISTAMBOULIE, G.; BHAND, S.; MARTY, J. L. Automated flow based biosensor for quantification of binary organophosphates mixture in milk using artificial neural network. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 208, p. 228-237, 2015.

MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. **Alexandria Journal of Food Science and Technology**, v. 11, p. 31-42, 2014.

MONTERO, I.; CHAGAS, E. A.; MELO FILHO, A. A.; SARAIVA, S. A.; SANTOS, R. C.; CHAGAS, P. C.; DUARTE, E. D. R. S. Evaluation of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Amazon Fruit. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 649-654, 2018.

MOREIRA, R. R. D. *et al.* Avaliação da atividade imunológica *in vitro* do extrato aquoso de *Endopleura uchi* Huber (Humiriaceae) – “uchi amarelo”. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 5, p. 82, 2007.

MORTON, J. F. **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource Systems, 1987.

MOTA, R. V.; FRANÇA, L. F. de. Estudo das Características da Ucuuba (*Virola Surinamensis*) e do Inajá (*Maximiliana regia*) com Vistas à Produção de Biodiesel. **Revista Científica da UFPA**, v. 6, n. 1, 2007.

MOURA, C. **Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo petit suisse**. 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MOURE, A.; SINEIRO, L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Functionality of oilseed protein products: a review. **Food Research International**, v. 39, p. 945-963, 2006.

MOUSTY, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - new trends. **Applied Clay Science**, v. 27, p. 159-177, 2004.

MUNDACA-URIBE, R.; VALENCIA-MUÑOZ, D.; FELICES, R. C.; HINOJOSA, J. N.; BUSTOS, M. A.; PEÑA-FARFAL, C. Bienzymatic Biosensor for Malic Acid Based on Malate Dehydrogenase and Transaminase Immobilized onto a Glassy Carbon Powder/Carbon Nanotubes/Nad⁺ Composite Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, p. 238-243, 2017.

MUREŞAN, L.; TURDEAN, G.; POPESCU, I. Rhodium stabilized Prussian Blue-modified graphite electrodes for H₂O₂ amperometric detection. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, n. 3, p. 349-355, 2008.

- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.
- NAOZUKA, J.; VIEIRA, E. C.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1667-1672, 2011.
- NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, 2008.
- NETO, J.; ROSSETTO, C. A. V. Concentração de nutrientes nas sementes: o papel do molibdênio. **Floresta e Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 171-183, 1998
- NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; BENEDETTE, R. M.; TOSIN, J. M.; CHAGAS, E. A. Characterization of the antioxidant capacity of natives fruits from the Brazilian Amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1165-1173, 2012.
- NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORM, D. E. BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.
- NOËL, L.; LEBLANC, J. C.; GUÉRIN T. Determination of several elements in duplicate meals from catering establishment using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: Estimation of daily dietary intake. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 44-56, 2003.
- NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N.; SINGH, A. K. Comparative merits of conventional and miniaturized High Performance Liquid Chromatography. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011.
- NOVI, A. M. Regression of aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas by reduced glutathione. **Science**, v. 212, p. 541-542, 1981.
- NUNES, R. S.; KAHL, V. F.; SARMENTO, M. S.; RICHTER, M. F.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RODRIGUES, F. A.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; MARTINEZ, M. M.; FERRONATTO, S.; FERRAZ, A. de B.; DA SILVA, J. Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 129-135, 2011.
- NUNES, G. S.; MARQUES, C V V C O ; CASTILLO, A ; BADEA, M ; MARTY, J L . Determinação de resíduos de inseticidas carbamatos em alimentos infantis utilizando biossensores amperométricos à base de enzimas acetilcolinesterases mutantes. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 13, n. 2, p. 2-8, 2005.
- NUNES, G. S.; BARCELO, D.; GRABARIC, B. S.; DÍAZCRUZ, J. M.; RIBEIRO, N. L. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase

charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 399, n.1/2, p. 37-49, 1999.

ODHAV, B.; BEEKRUM, S.; AKULA, US.; BAIJNATH, H. Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 5, p. 430-435, 2007.

OLIVEIRA, G. C.; MOCCELINI, S. K.; CASTILHO, M.; TEREZO, A. J.; POSSAVATZ, J.; MAGALHÃES, M. R. L.; DORES, E. F. G. C. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, v. 98, p. 130-136, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B. GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais anti-oxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A. I. T. Bioprospecção das atividades biológicas de palmeiras (Arecaceae) nativas do estado do Tocantins e estudos químicos de compostos bioativos contra patógenos humanos. 2017. 76 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2017.

OLIVEIRA, C. C.; GRANATO, D.; CARUSO, M. S. F.; SAKUMA, A. M. **Manual para a elaboração de cartas de controle para monitoramento de processos de medição quantitativos em laboratórios de ensaio**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2013.

OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDAO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n.2, p. 23-31, 2003.

OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; BEZERRA, L. C. N. M.; SILVEIRA, S. B.; MONTEIRO, A. C. O.; MOREIRA, R. A. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquática* Aubl, *Sterculia striata* StHil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. **Food Chemistry**, v. 70, p. 185-191, 2000.

OMBRA, M. N.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F.; RICCARDI, R.; SPIGNO, P.; ZACCARDELLI, M.; PANE, C.; MAIONE, M.; FRATIANNI, F. Phenolic composition and antioxidant and antiproliferative activities of the extracts of twelve common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) endemic ecotypes of Southern Italy before and after cooking. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-12, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3593-3600, 2008.

- PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Journal of Nanotechnology**, v. 8, p. 5535-5559, 2008.
- PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
- PÉREZ, D. Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región ucayali. **Folia Amazónica**, v. 13, p. 1-2, 2002.
- PERO, R. W.; LUND, H.; LEANDERSON, T. Antioxidant Metabolism Induced by Quinic Acid. Increased Urinary Excretion of Tryptophan and Nicotinamide. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 3, p. 335-346, 2009.
- PIERMARINI, S.; MIGLIORELLI, D.; VOLPE, G.; MASSOUD, R.; PIERANTOZZI, A.; CORTESE, C.; PALLESCHI, G. Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum. **Sensors and Actuators B**, v. 179, p. 170-174, 2013.
- PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, p. 1-5, 2017.
- PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, 2011.
- POLITI, F. A. S.; DE MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2757-2768, 2011.
- PRASAD, K. N. Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of antioxidant compounds for reducing oxidative stress and chronic inflammation in human Alzheimer's disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 153, p. 41-47, 2016.
- PRIETO-SIMÓN, B.; CAMPAS, M.; MARTY, J-L. Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, p. 757-763, 2008.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. J. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: composição e possíveis benefícios**. 2010. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RAHMAN, T.; HOSEN, I.; ISLAM, M. M. T.; SHEKHAR, H. U. Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 997-1019, 2012.

RAITERI, R.; GRATTAOLA, M.; BERGER, R. Micromechanics Senses Biomolecules. **Materials Today**, p. 22-29, 2002.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA, v. 2, 2002.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de; PELÚZO, M, do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 389-407, 2005.

RIOS, M. N. S.; PASTORE JUNIOR, F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011.

RISO, P.; VISIOLI, F.; GARDANA, C.; GRANDE, S.; BRUSAMOLINO, A.; GALVANO, F.; GALVANO, G.; PORRINI, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 941-947., 2005.

ROCHA, A. P.; CARVALHO, L. C.; SOUSA, M. A.; MADEIRA, S. V.; SOUSA, P. J.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; RESENDE, A. C.; MOURA, R. S. S. Endotheliumdependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97-104, 2007.

ROCHA, J. C., ROSA, A. H., CARDOSO, A. A. **Introdução à química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.

ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W. de; ARAÚJO, M. A. da M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. dos R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 933-941, 2013.

ROCKS, B. F.; SHERWOOD, R. A.; RILEY, C. Direct determination of therapeutic concentrations of lithium in serum by flow-injection analysis with atomic-absorption spectroscopic detection. **Clinical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 440-443, 1982.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M.; ALEMÁN-NAVA, G. S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, J. M.; DIECK-ASSAD, G.; MARTÍNEZ-CHAPA, S. O.; BARCELÓ, D.; PARRA, R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21-45, 2015.

RODRIGUEZ, M. C.; RIVAS, G. A. Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase Analytical applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 43-51, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: International Life Sciences Institute, 2001.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROUILLON, R.; TOCABENS, M.; MARTY, J. L. Stabilization of chloroplasts by entrapment in polyvinyl alcohol bearing styrylpyridinium groups. **Analytical Letters**, v. 27, p. 2239-2248, 1994.

RUFINO, M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SALOMONE, F.; GODOS, J.; ZELBER-SAGI, S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. **Liver International**, v. 36, p. 5-20, 2016.

SALVADOR, J. T.; CARVALHO, T. C.; LUCCHESI, L. A. C. Calcium/magnesium ratio in soil and foliar levels macronutrients. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 27-32, 2011.

SAMPSON, M.; RUDDER, M.; Elin, R. J. Lithium determinations evaluated in 8 analyzers. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 869-872, 1994.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2002.

SANTOS JÚNIOR, R. Q. ; SOARES, L. C. ; MAIA FILHO, A. L. M. ; ARAUJO, K. S.; SANTOS, I. M. S. P. ; COSTA JÚNIOR, J. S. ; SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, v. 9, p. 575-581, 2010.

SANTOS, M, R, A.; LIMA M, R. Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil. **Saber Científico**, v. 1, n. 1, p. 38-57, 2008.

- SANTOS, M. F. G.; MAMEDE, R. V. S.; RUFINO, M. S. M.; BRITO, E. S. B.; ALVES, R. E. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. **Antioxidants**, v. 4, p. 591-602, 2015.
- SARMA, A.; MALLICK, A. R.; GHOSH, A. K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1., n. 3, p. 185-192, 2010.
- SAUNDERS, D. S. Letter: United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs, 1985.
- SEKAR, N. C.; SHAEGH, S. A. M.; NG, S. H.; GE, L.; TAN, S. N. A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 204, p. 414-420, 2014.
- SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006.
- SCHRAUZER, G. N. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 14-21, 2002.
- SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 528-39, 2013.
- SHALMI, M.; KIBBLE, J. D.; DAY, J. P.; CHRISTENSEN, P.; ATHERTON, J. C. Improved analysis of picomole quantities of lithium, sodium, and potassium in biological-fluids. **American Journal of Physiology-Renal**, v. 267, n. 4, 1994.
- SHALOM, J.; COCK, I. E. *Terminalia ferdinandiana* Exell. Fruit and Leaf Extracts Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis in Selected Human Cancer Cell Lines. **Nutrition and Cancer**, 2018.
- SHANLEY, P.; GAIA, G. A “fruta do pobre” se torna lucrativa: a *Endopleura uchi* Cuatrec. em áreas manejadas próximo a Belém. In: ALEXIADES, M. N.; SHANLEY, P. **Productos forestales, medios de subsistencia y conservación**: Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Centro para la Investigación Forestal Internacional, Bogor, v.3, p. 499, 2004.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.
- SHANLEY, P.; SERRA M.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: Cifor, 2 ed, 2010.

SHARONI, Y.; DANILENKO, M.; LEVY, J. Molecular mechanism for the anticancer activity of the carotenoid lycopene. **Drug Development Research**, v. 50, p. 448-456, 2000.

SHAVANOVA, K.; BAKAKINA, Y.; BURKOVA, I.; SHTEPLIUK, I.; VITER, R.; UBELIS, A.; BENI, V.; STARODUB, N.; YAKIMOVA, R.; KHRANOVSKYY, V. Application of 2D Non-Graphene Materials and 2D Oxide Nanostructures for Biosensing Technology. **Sensors**, v. 16, n. 223, p. 1-23, 2016.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. Modern nutrition in health and disease. **Philadelphia: Lea & Fibiger**, v. 8, n. 2, 1994.

SIGUEMOTO, É. S.; GUT, J. A. W. Validation of spectrophotometric microplate methods for polyphenol oxidase and peroxidase activities analysis in fruits and vegetables. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 148-153, 2017.

SILVA, A. C.; SANTOS, A. R.; PAIVA, A. V. Translocação de nutrientes em folhas de *Hevea brasiliensis* (clone) e em acículas de *Pinus oocarpa*. **Revista Universitária de Alfenas**, v. 4, p. 11-18, 1998.

SILVA, B. L. A.; BORA, P. S.; AZEVEDO, C. C. Caracterização química parcial das Proteínas das Amêndoas da Munguba (*Pachira aquatica Aubl*). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 333-340, 2010.

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 689-694, 2005.

SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R. Phenolic profile and biological potential of Endopleura uchi extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 889-897, 2015.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants e A review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, p. 828-835, 2013.

SINGH, S.; SINGH, R. P. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. **Food Reviews International**, v. 24, p. 392-415, 2008.

SINGH, M.; VERMA, N.; GARG, A. K.; REDHU, N. Urea biosensors, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, p. 345-351, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.

SIQUEIRA, E. P.; ANDRADE, A. A.; FAGUNDES, E. M. S.; RAMOS, J. P.; KOHLHOFF, M.; NUNES, Y. R. F.; VELOSO, M. D. M.; CAMPOS, F. F.; HOJANN, S.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B. *In vitro* antibacterial action on methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus*

aureus and antitumor potential of *Mauritia flexuosa* L. f. **Journal of Medicinal Plant Research**, v., n. 48, p. 1408-1417, 2014.

SIRDAARTA, J.; MAEN, A.; RAYAN, P.; MATTHEWS, B.; COCK, I. E. High Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry Analysis of High Antioxidant Australian Fruits with Antiproliferative Activity Against Cancer Cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p. 5181-5194, 2016.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOH, Y.; KIM, J. A.; SOHN, N. W.; LEE, K. R.; KIM, S. Y. Protective effects of quinic acid derivatives on tetrahydropapaveroline induced cell death in C6 glioma cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 803-807, 2003.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. H.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, H. **Avaliação de uma blindagem eletromagnética para frequências até 1 Hz**. CienteFico, v. 3, Salvador, 2003.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: Resende, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, v. 4, cap. 15, p. 529-568, 2017.

SOUZA, M. O.; SANTOS, R. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius): chemical composition and bioactivity. Nutrire: **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, vol. 36, n. 2, p. 161-169, 2011.

SOUZA, M. P. **Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari (*Cassia leiandra*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*)**. 2016. 126 f Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

SOUZA, V. R. de; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. de D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381-386, 2012.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 753-758, 2003.

STAFUSSA, A. P.; MACIEL, G. M.; RAMPAZZO, V.; BONA, E.; MAKARA, E. N.; DEMCZUK JR., B.; HAMINIUK, C. W. I. Bioactive compounds of 44 traditional and

exotic Brazilian fruit pulps: phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n.1, p. 106-118, 2018.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n, 10, p. 1027-1039, 1996.

STOYTCHIEVA, M.; ZLATEV, R.; GONZALEZ NAVARRO, F.F.; VELKOVA, Z.; GOCHEV, V.; MONTERO, G.; AYALA BAUTISTA, A.G.; TOSCANO-PALOMAR, L. PVA-AWP/tyrosinase functionalized screen-printed electrodes for dopamine determination. **Analytical Methods**, v. 8, p. 5197-5203, 2016.

STUART, E. C.; SCANDLYN, M. J.; ROSENGREN, R. J. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. **Life Sciences**, v. 79, p. 2329-2336, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, v.104, n. 3, p. 1106-1114, 2007.

SUMAN, G.; PRAJAPATI, D. R. Control chart applications in healthcare: a literature review. **International Journal of Metrology and Quality Engineering**, v. 9, n. 5, p. 1-21, 2018.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed, São Paulo: Campinas, NEPA-UNICAMP, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009,

TAN, G.T. *et al.* Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 143-154, 1991.

TALEUZZAMAN, M. Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ). **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**, v. 7, n.5, p. 1-5, 2018

TELES, V. de L. das G. **Elementos minerais nas polpas das frutas cupuaçu (*Theobromagrandiflorum*Schum), dâo (*Ziziphusmauritiana*Lam), ingá (*Ingaedulis*Mart) e folhas do dâo..** 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química Ambiental). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; AFONSO, J. C. **Para que servem os elementos químicos**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

VAITSMAN, D. S.; VAITSMAN, E. P.; AZEVEDO, I. S. Determinação de metais alcalinos em frutas por fotometria de chama. **Química Nova**, v. 14, p. 51, 1991.

VANELLA, A.; DIGIACOMO, C.; SORRENTI, V.; RUSSO, A.; CASTORINA, C.; C AMPISI, A.; RENIS, M.; PEREZ-POLO, J. R. Free Radical Scavenger Depletion in

Post-ischemic Reperfusion Brain Damage. **Neurochemical Research**, v. 18, p. 1337-1340, 1993.

VANHOE, H.; DAMS, R.; VERSIECK, J. Use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace elements in human serum. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 9, n. 1, p. 23-31, 1994.

VANNUCCHI, H.; ROCHA, M. M. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Ácido ascórbico (Vitamina C)**. São Paulo: International Life Sciences Institute do Brasil, 2012.

VARVARI, L.; POPESCU, I. C. New method for antioxidant activity evaluation using a H₂O₂ amperometric sensor. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 55, p. 851-857, 2010.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima: TCA, 1996.

VIRGOLIN, L. B.; SEIXAS, R. S. F.; JANZANTTI, N. S. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidant activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 10, p. 933-941. 2017.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.54, n.1, p.371-377, 2011.

WANG, H. Q.; LI, D. L.; DU, Z. Y.; HUANG, M. T.; CUI, X. X.; LU, Y. J.; ZHANG, K. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Chinese Ilicifolius Vegetable (*Acanthopanax Trifoliatum* (L) Merr) and Its Reference Compounds. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 113-1138, 2015.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 701-705, 1996.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.

WANG, Y.; ZHU, J.; ZHU, R.; ZHU, Z.; LAI, Z.; CHEN, Z. Chitosan/Prussian Blue-based biosensors. **Measurement Science and Technology**, v. 14, p. 831-836, 2003.

WANG, L. F.; CHEN, J. Y.; XIE, H. H.; JU, X. R.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of adlay varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, p. 5103-5113, 2013.

WANG, Y.; ZHAO, L.; WANG, D.; HUO, Y.; JI, B. Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: Antioxidant activity and

inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 2494-2503, 2016.

WHO. World Health Organization. **Guideline**: Sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2012.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39-49, 2016.

XIANG, T.; XIONG, Q. B.; KETUT, A. I.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; WU, L. J.; KADOTA, S. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. **Planta Medica**, v. 67, n. 4, p. 322-325, 2001.

XU, D-P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J-J.; LI, H-B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 96, p. 1-32, 2017.

XU, Z.; CHEN, X.; DONG, S. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 899-908, 2006.

YAMAGUCHI, K. K. de L. **Caracterização de substâncias fenólicas de resíduos de frutos Amazônicos e avaliação para o uso biotecnológico**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGET, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu). **Journal of Natural Products**, n. 66, p. 1501-1504, 2003.

YEN, G. C.; DUHB, P. D.; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307-313, 2002.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; MATHIAS, C. de S.; SILVA, L. M.; SOUZA, F. das C. do A. Frutos amazônicos com baixa densidade energética: quais os constituintes nutricionais? **Revista SODEBRAS**, v. 8, n. 87, 2013.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. 109 de J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatória* Mart. oriundo de diferentes 111 ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZANATTA, C. F.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; ROCHA-FILHO, P. A.; VINARDELL, M. P. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 70-75, 2010.

ZERBINATI, O.; BALDUZZI, F.; DELL'ORO, V. Determination of lithium in wines by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 645-650, 2000.

ZHANG, Y-J.; GAN, R-Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A-N.; XU, D-P.; LI, H-B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Molecules**, v. 20, p. 21138-21156, 2015.

ZHANG, Z-S.; LI, D.; WANG L-J.; OZKAN, N.; CHEN, X. D.; MAO, Z-H.; YANG, H-Z. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 17-24, 2007.

ANEXO A

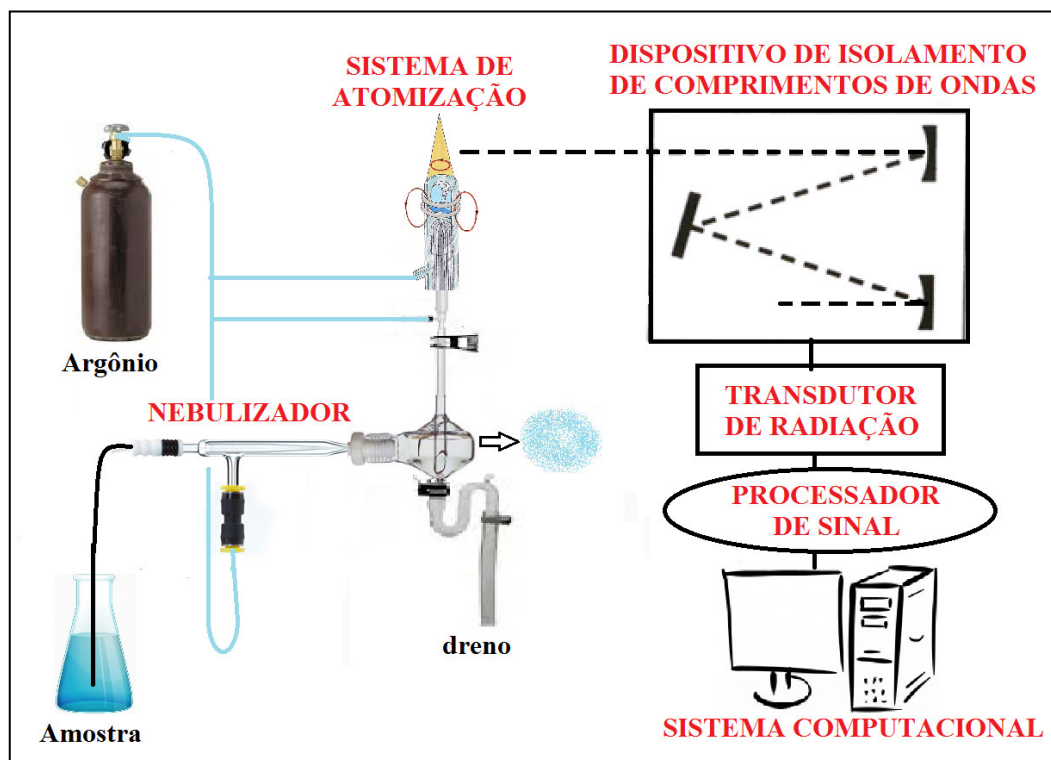


Figura A1 - Esquema de funcionamento e componentes típicos do sistema de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (Adaptado de DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH et al., 2013).

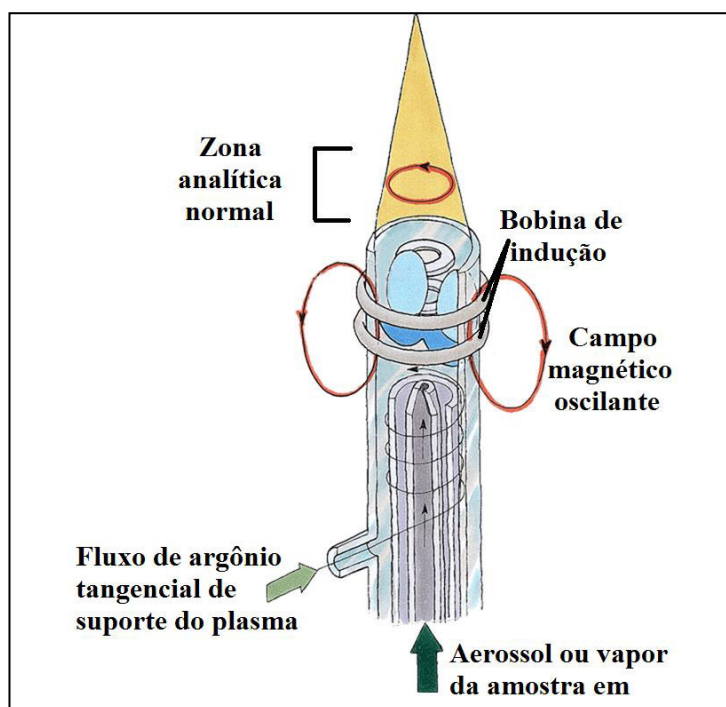


Figura A2 - Esquema da tocha e plasma formado usado em ICP OES (Adaptado de DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH et al., 2013).

Funcionamento Resumido de um Sistema ICP OES:

A amostra, geralmente em solução aquosa, é aspirada por um fluxo de argônio sob alta pressão (efeito Bernoulli) e levada ao sistema de nebulização (1) onde é convertida a um fino aerossol por um jato de gás comprimido. Existem vários tipos de nebulizadores no mercado, em que dois deles são mais comuns: o nebulizador concêntrico, o qual foi empregado neste estudo, é o mais utilizado devido sua simplicidade na construção, reprodutibilidade e baixo custo; o nebulizador de fluxo cruzado ou transversal (*cross-flow*) que geralmente bombeiam a amostra com auxílio de uma bomba peristáltica e apresentam menores problemas de entupimento e maior resistência a corrosão e ataques químicos (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

O fluxo do gás leva o aerossol produzido no sistema de nebulização para o sistema de atomização (2) através do fluxo de argônio do tubo central da tocha. Na tocha, a elevada temperatura, promovida pelo plasma de argônio, permite a produção de átomos e íons em fase gasosa e suas consequentes excitações e relaxações, acompanhadas da produção de linhas espectrais, a qual é característica da espécie atômica sob estudo e proporcional a população de átomos presente na amostra, a qual obedece a lei de Lambert-Beer (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

Um plasma, por definição, é uma mistura gasosa condutiva contendo uma concentração significativa de cátions e elétrons, com uma carga total próxima de zero (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013), o qual é formado e mantido por um fluxo de gás de argônio em um campo magnético de alta frequência em uma tocha de quartzo, constituída de três tubos concêntricos, conforme o esquema apresentado na Figura A2.

Na tocha, o tubo central conduz a amostra na forma de aerossol, procedente do nebulizador; no tubo intermediário flui gás auxiliar para a estabilização do plasma; no tubo externo flui gás argônio em um fluxo tangencial às paredes a fim de resfriá-las impedindo sua fusão tendo em vista as elevadas temperaturas, bem como centralizar o plasma.

A zona analítica normal é a região do plasma onde são realizadas as determinações da radiação emitida, a qual pode ser realizada em ângulos retos (geometria de observação radial) ou sob o eixo axial do plasma (geometria de observação axial). A geometria radial oferece melhor estabilidade e precisão, enquanto a geometria axial apresenta menores

limites de detecção e sensibilidade, sendo esta última almejada na análise de elementos em níveis traços.

A emissão atômica ou iônica do plasma é separada em seus comprimentos de onda constituintes por um dispositivo isolador de comprimentos de ondas (3) equipado com dispositivos que melhoram a seletividade e sensibilidade instrumental. A radiação isolada é convertida em sinal elétrico por um transdutor, múltiplos transdutores ou por um arranjo de detectores (3). Os sinais elétricos são então processados (4), produzindo a leitura da radiação na forma de intensidade de emissão ou concentração, além de uma série de informações necessárias ao controle de qualidade analítico (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

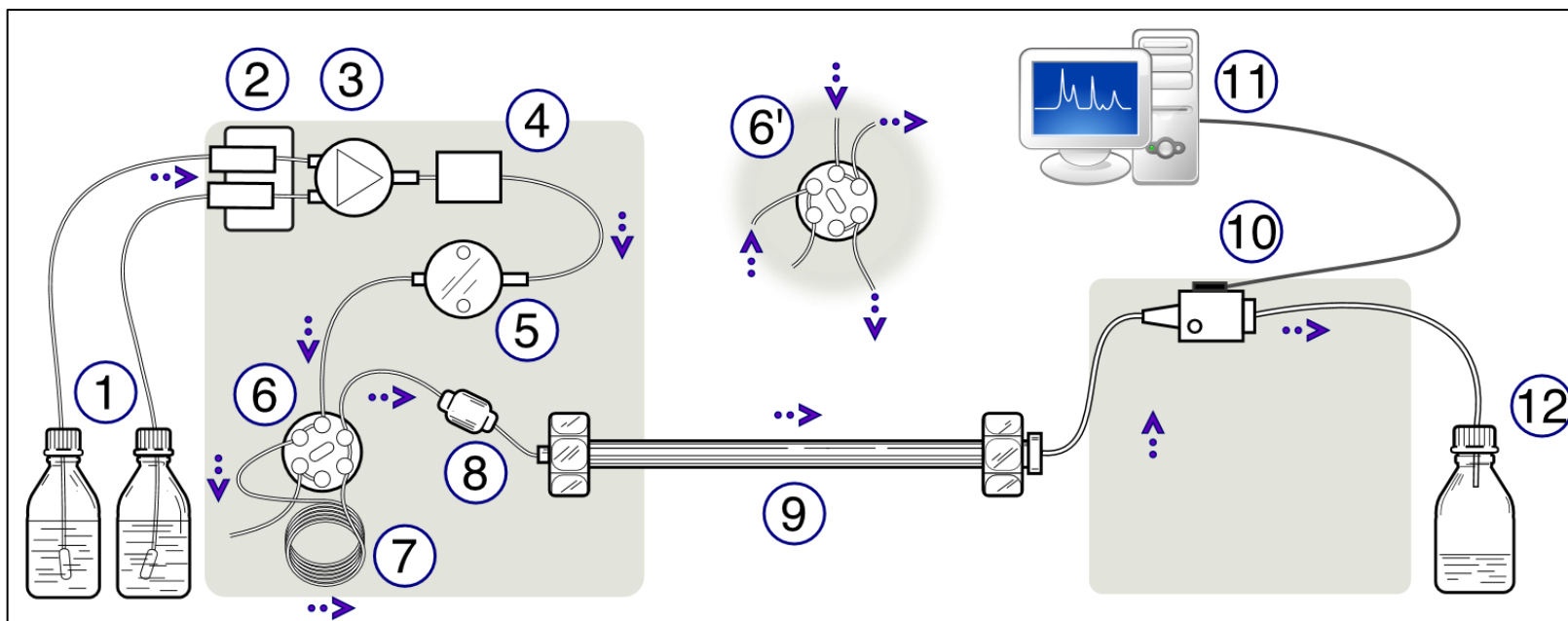


Figura A3 - Representação esquemática de um sistema para CLAE: (1) reservatório da fase móvel; (2) degaseificador de solventes; (3) válvula de gradiente; (4) reservatório misturador; (5) bomba de alta pressão; (6) válvula de comutação; (7) injetor da amostra; (8) pré-coluna (coluna de proteção); (9) coluna analítica; (10) detector; (11) processador de dados; (12) recipiente de coleta (Produzido por Yassine Mrabet).

Funcionamento Resumido de um Sistema CLAE:

O uso de uma fase estacionária (sólido) e outra móvel (líquido) permite que os componentes da amostra sejam transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e a separação dos componentes de uma mistura complexa ocorra com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

Resumidamente, a bomba (5) movimenta a fase móvel (1) formada por um único solvente ou uma mistura de solventes de composição constante (eluição isocrática) ou ainda um sistema de solventes que diferem em polaridade (eluição por gradiente). O fluxo da fase móvel leva a amostra injetada (7) através da coluna analítica (9) que contém a fase estacionária. Os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades, em que as substâncias com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente, ao passo que as substâncias com pouca afinidade com esta fase movem-se mais rapidamente. Ao passar pela coluna, os componentes são levados ao detector (10) que registra o sinal em função do tempo (ou do volume da fase móvel), o qual é processado (11) pela eletrônica do instrumento gerando uma série de picos da concentração do soluto em função do tempo de eluição (ou volume de eluição). As posições dos picos no eixo do tempo são empregadas na identificação dos componentes, enquanto as áreas sobre os picos são usadas na quantificação através da comparação da área de um padrão cuja pureza é conhecida, com a área da amostra em questão (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; GHOSH *et al.*, 2013).

ANEXO B

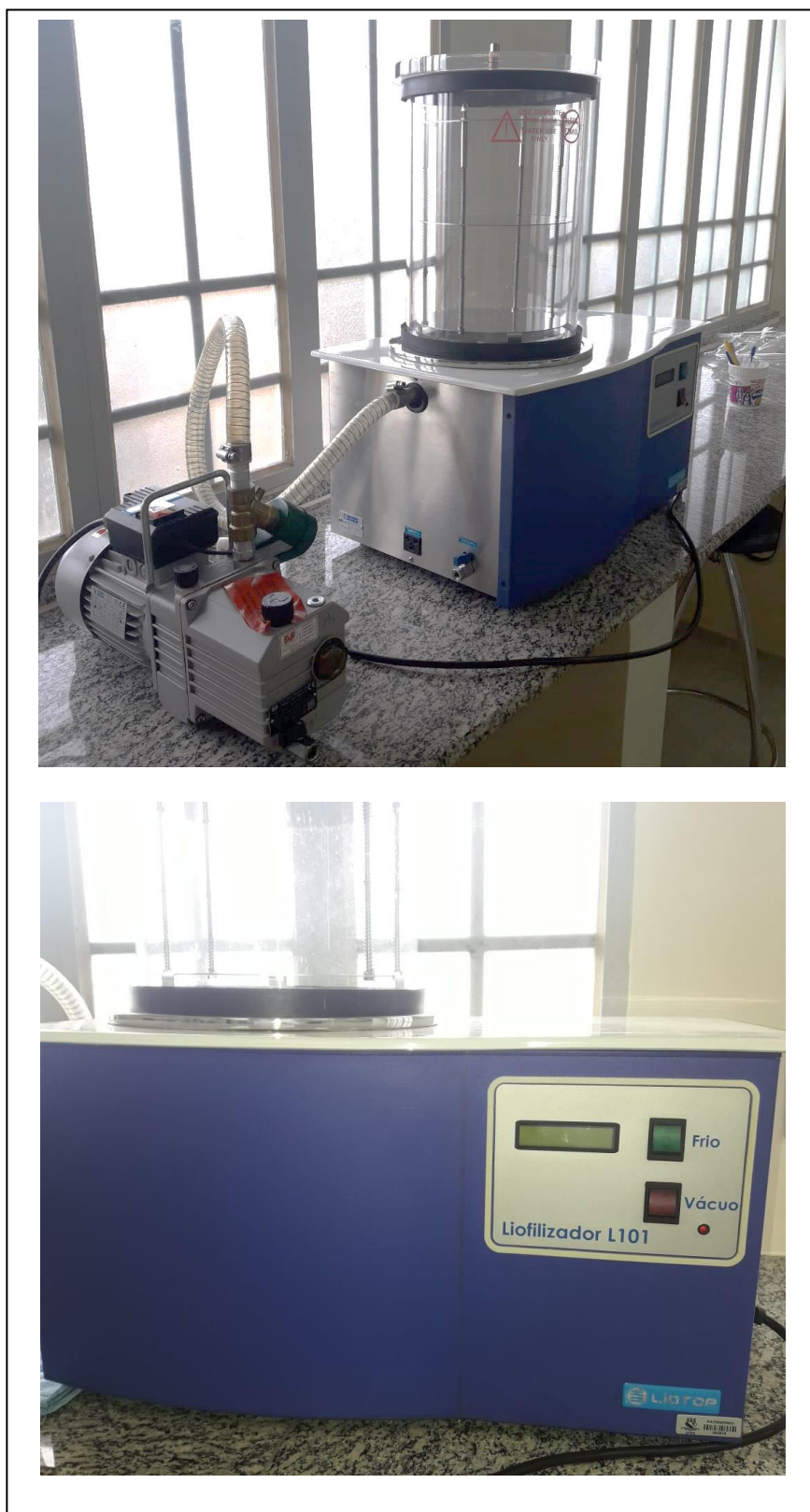


Figura B1 - Fotos do liofilizador utilizado no pré-preparo das amostras.



Figura B2 - Fotos do forno micro-ondas usado na extração dos minerais das amostras de frutos amazônicos. Destaque dado ao carrossel contendo os vasos de Teflon.



Figura B3 - Fotos do Espectrofotômetro Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).



Figura B4 - Foto do Sistema de Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) (LABBULLETIN, 2019).



Figura B5 - Fotos do Potenciostato, com destaque para o conector feito sob encomenda para acoplamento do biossensor.

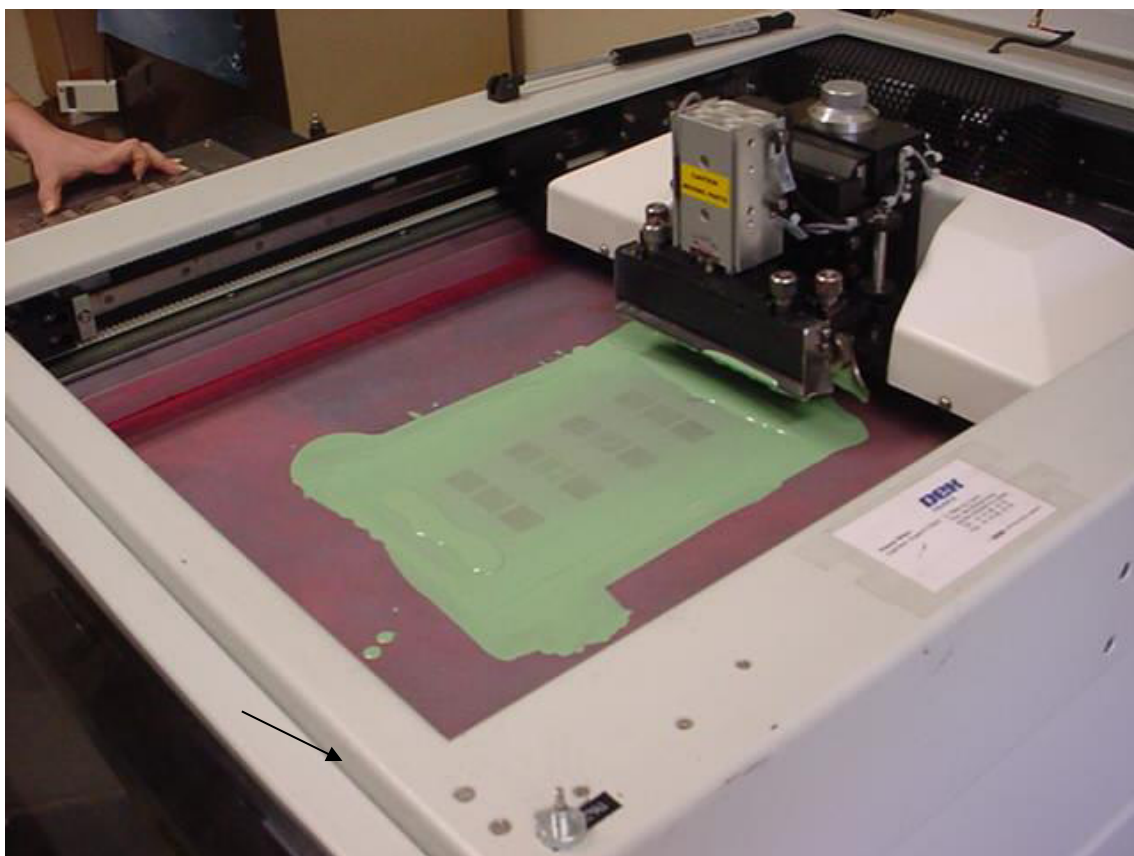


Figura B6 - Fotos da máquina de serigrafia, no momento da produção de sensores eletroquímicos (eletrodos), a partir da deposição sucessiva de camadas de tinta e pastas de grafite e Ag/AgCl, sobre um placa fina de PVC.

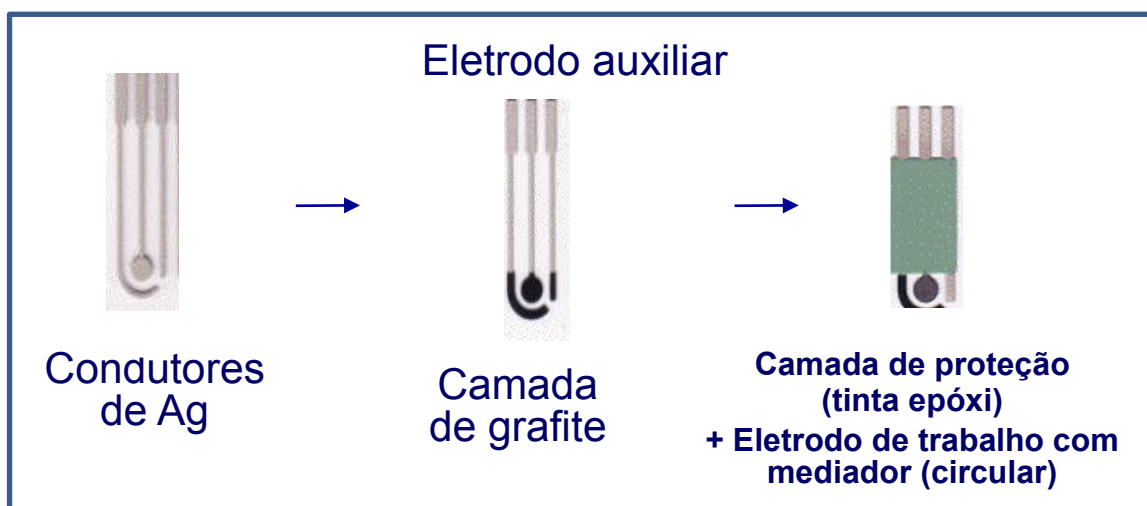


Figura B7 - Esquema de deposição das camadas do sensor eletroquímico, formando os três eletrodos, empregando-se a máquina de serigrafia.



Processo de liofilização



Amostras liofilizadas

Figura B8 - Foto do esquema de liofilização das amostras de frutos e armazenamento a vácuo das amostras liofilizadas.